



Die Analyse einer Ribokinase als neue  
myogenese-relevante Komponente und erste Hinweise auf  
eine Beteiligung von  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Faktoren in der  
Myogenese von *Drosophila melanogaster*

Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat)

dem  
Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

Barbara Griemert, geb. Wierach  
aus Bremerhaven

Marburg/Lahn 2010

Vom Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am  
angenommen

Erstgutachterin: Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl

Zweitgutachterin: Prof. Dr. Monika Hassel

Tag der mündlichen Prüfung am: 04.05. 2010

חיים זה לא פיקניק!

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>2</b>
2.1	<i>Drosophila melanogaster</i> als Modellorganismus der Entwicklungsbiologie . . . . .	2
2.2	Die Determination des Mesoderms . . . . .	2
2.3	Die Differenzierung des Mesoderms . . . . .	3
2.4	Die Entwicklung der vizeralen Muskulatur . . . . .	5
2.5	Die Entwicklung der somatischen Muskulatur . . . . .	7
2.5.1	Die Fusion der Myoblasten erfolgt in zwei Schritten . . . . .	7
2.5.2	Der zweite Schritt der somatischen Fusion kann in ultrastrukturell auflösbare Abschnitte gegliedert werden . . . . .	12
2.6	Ribokinasen . . . . .	13
2.7	Kalzium als Signalmolekül in der Myogenese . . . . .	17
2.8	Problemstellung: Identifikationen neuer Komponenten in der Myogenese . . . . .	20
2.8.1	Die Mutante <i>E832</i> (P3-106/2) und ihre mögliche Rolle in der Mesodermentwicklung . . . . .	20
2.8.2	Kalzium-Bindeproteine in der Myogenese . . . . .	20
<b>3</b>	<b>Material</b>	<b>22</b>
3.1	Geräte . . . . .	22
3.2	Chemikalien . . . . .	22
3.3	Enzyme . . . . .	22
3.4	Molekularbiologische Reagenzien und Reagenziensätze . . . . .	23
3.5	Sonstige Materialien . . . . .	23
3.6	Antikörper und Seren . . . . .	24
3.7	Lösungen und Puffer . . . . .	25
3.8	Nähr- und Zuchtmedien . . . . .	28
3.9	Synthetische Oligonukleotide . . . . .	28
3.10	Sequenzierung . . . . .	29
3.11	cDNAs . . . . .	29
3.12	Fliegenstämme . . . . .	30



<b>4</b>	<b>Methoden</b>	<b>32</b>
4.1	Allgemeine molekularbiologische Methoden . . . . .	32
4.1.1	Herstellung chemisch kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen . . . . .	32
4.1.2	Transformation von Plasmid-DNA in kompetente <i>Escherichia coli</i> -Zellen . . . . .	32
4.1.3	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> . . . . .	32
4.1.4	Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration . . . . .	33
4.1.5	DNA-Präzipitation mit Ethanol . . . . .	33
4.1.6	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen . . . . .	34
4.1.7	Extraktion von DNA aus Agarosegelen . . . . .	34
4.1.8	Polymerasekettenreaktion (PCR) . . . . .	34
4.1.9	Klonierung von PCR-Produkten in den TOPO-Vektoren . . . . .	35
4.1.10	Enzymatische Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen . . . . .	36
4.1.11	Dephosphorylierung von freien 5'-Enden . . . . .	36
4.1.12	Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren . . . . .	36
4.2	Arbeiten mit <i>Drosophila melanogaster</i> . . . . .	36
4.2.1	Die Haltung und Zucht von Fliegen . . . . .	36
4.2.2	Sammeln von Fliegenembryonen . . . . .	37
4.2.3	Fixierung von Fliegenembryonen . . . . .	37
4.2.4	P-Element-Keimbahntransformation . . . . .	37
4.2.5	Das UAS-Gal4-System . . . . .	38
4.3	Histologische Methoden . . . . .	39
4.3.1	Immunhistochemische Färbung nach der ABC-Methode . . . . .	39
4.3.2	Immunofluoreszenzfärbungen . . . . .	40
4.3.3	Tyramid-Signal-Verstärkung (Tyramide-Signal-Amplification - TSA) . . . . .	40
4.3.4	In situ-Hybridisierungen an <i>Drosophila</i> -Embryonen . . . . .	41
4.3.5	Herstellung von Epon-Dauerpräparaten . . . . .	42
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>43</b>
5.1	Die EMS-Mutante <i>E832 (P3-106/2)</i> zeigt deutliche Störungen im somatischen und viszeralem Mesoderm von <i>Drosophila melanogaster</i> . . . . .	43
5.1.1	Die Entwicklung des somatischen Mesoderms ist in <i>E832</i> gestört . . . . .	43
5.1.2	Die Entwicklung des viszeralem Mesoderms in <i>E832</i> entspricht nicht der Wildtyp-Situation . . . . .	46
5.2	Das <i>E832</i> -Chromosom enthält zwei Letalmutationen, die in homozygoter Situation zu Myogenese-Störungen führen . . . . .	49

5.3	Transheterozygoten-Analysen zeigen, dass Mutationen in beiden genomischen Regionen einen Myogenese-Defekt hervorrufen . . . . .	51
5.4	Die phänotypische Analyse der entkoppelten Linien zeigt überraschenderweise drei individuelle Mutationen . . . . .	53
5.4.1	<i>32-sm</i> und <i>bubbles</i> <sup>33E-m</sup> , aber nicht <i>33E-vm</i> , zeigen Defekte im somatischen Mesoderm . . . . .	54
5.4.2	Der viszerale Phänotyp ist in den entkoppelten Mutanten <i>33E-vm</i> und <i>bubbles</i> <sup>33E-m</sup> nicht mehr so deutlich manifestiert wie in <i>E832</i> . . . . .	57
5.4.3	Die Mutante <i>bubbles</i> <sup>33E-m</sup> zeigt eine verringerte Anzahl somatischer rP298 <i>lacZ</i> -positiver Zellkerne in Stadium 16 . . . . .	61
5.4.4	In <i>bubbles</i> <sup>33E-m</sup> -Embryonen sind viele $\beta$ 3-Tubulin-negative, unfusionierte Myoblasten und eine erhöhte Anzahl von Makrophagen zu beobachten . . . . .	62
5.5	In den beiden genomischen Bereichen, in denen die Mutationen von <i>E832</i> lokalisieren, liegen viele uncharakterisierte Gene . . . . .	64
5.5.1	Es liegen viele Gene in der Region 32F2-33A1 . . . . .	64
5.5.1.1	Viele der untersuchten Gene zeigen keine spezifische RNA-Expression im Embryo . . . . .	64
5.5.1.2	Die RNAs von <i>CG12602</i> , <i>CG6614</i> und <i>kekkon-2</i> sind im Embryo von <i>Drosophila</i> exprimiert . . . . .	66
5.5.1.3	Das Myosin-ATPase-Domänenprotein CG4983 interagiert mit Arp1, zeigt aber keine Expression im Embryo . . . . .	67
5.5.2	Es liegen sechs Gene in der Region 33E1-33E3 . . . . .	71
5.5.2.1	<i>CG31862</i> wird spezifisch in den Tracheen exprimiert . . . . .	72
5.5.2.2	Die RNA von <i>bruno-2</i> wird im Endoderm und den Malpighischen Gefäßen exprimiert . . . . .	73
5.5.2.3	Die mRNA von <i>CG31763</i> wird in den Garlandzellen und Speicheldrüsen exprimiert . . . . .	74
5.5.2.4	Pkd2 wird in den Garlandzellen und im Proventrikulus exprimiert . . . . .	76
5.5.3	Zusammenfassung der differenzierten Analyse von ausgewählten Genen der genomischen Bereiche 32F2-33A1 und 33E1-33E3 . . . . .	77
5.6	Die Ribokinase <i>CG17010</i> ( <i>D-Rbks</i> <sup>33E</sup> ) ist früh mesodermal exprimiert und kann den somatischen Phänotyp von <i>bubbles</i> <sup>33E-m</sup> retten . . . . .	77
5.6.1	<i>D-Rbks</i> <sup>33E</sup> zeigt eine embryonale RNA-Expression . . . . .	77
5.6.2	Der somatische Phänotyp in <i>bubbles</i> <sup>33E-m</sup> wird von UAS- <i>D-Rbks</i> <sup>33E</sup> gerettet . . . . .	78
5.6.3	Die Sequenzierung des kodierenden Bereiches von <i>D-Rbks</i> <sup>33E</sup> zeigt eine Basendeletion in <i>D-Rbks</i> <sup>bubbles33E-m</sup> -Mutanten, was in einem verkürzten Protein resultiert . . . . .	80

5.6.4	Die Überexpression von D-Rbks <sup>33E</sup> in allen Myoblasten-Zelltypen hat schwache somatische Defekte zur Folge . . . . .	81
5.6.5	Der Sequenzvergleich von D-Rbks <sup>33E</sup> mit diversen Vertretern der Ribokinase-Klasse aus anderen Organismen zeigt eine hohe Übereinstimmung . . . . .	82
5.6.6	Eine weitere <i>Drosophila</i> -spezifische Ribokinase ist wahrscheinlich nicht im Embryo exprimiert . . . . .	83
5.7	Das Ca <sup>2+</sup> -Bindprotein Kosh (CG10641) ist im somatischen und viszeralem Mesoderm exprimiert . . . . .	85
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>87</b>
6.1	Die auf dem zweiten Chromosom kartierte EMS-Mutante <i>E832</i> (P3-106/2) ist in drei Mutanten mit Defekten im somatischen sowie im viszeralem Mesoderm trennbar . . .	87
6.1.1	In dem genomischen Bereich 32F2-33A1 kann bisher kein Gen definitiv für den Muskelphänotyp von <i>32F-sm</i> zugewiesen werden . . . . .	89
6.1.1.1	Der mutante Phänotyp von <i>32F-sm</i> kann eine fehlerhafte Fusion der FCMs mit den FCs als Ursache haben . . . . .	89
6.1.1.2	Die Datenbank-gestützte Suche und die ersten Experimente ergaben keinen Hinweis auf einen putativen in der Myogenese relevanten Faktor . . . . .	90
6.1.1.3	Ein möglicher Kandidat in 32F2-33A1 ist CG4983, welches mit Arp1, einem Mikrotubuli-assoziierten Protein, interagiert soll . . . . .	91
6.1.1.4	Es ergeben sich noch weitere mögliche Kandidaten, welche sich möglicherweise für den mutanten Phänotyp in den Embryonen von <i>32F-sm</i> verantwortlich zeichnen können . . . . .	94
6.1.2	Der in <i>E832</i> einleitend beschriebene viszerale mesodermale Phänotyp in Form einer möglichen fehlerhaften Determination von FCs und/oder FCMs wird mutmaßlich durch einen in <i>33E-vm</i> mutierten, aber bisher noch unbekannten Faktor verursacht . . . . .	95
6.1.3	Wahrscheinlich zeigen <i>bubbles</i> <sup>33E-m</sup> -Mutanten keinen Determinations-, sondern einen Fusionsdefekt . . . . .	96
6.1.4	In <i>bubbles</i> <sup>33E-m</sup> besteht vermutlich ein Defekt in der Integrität der Myoblasten, weil keine Fusionen stattfinden und die Zellen anschließend von Makrophagen entfernt werden . . . . .	98
6.1.5	In der genomischen Region 33E1-33E3 sind Gene mit einer Expression in anderen Geweben als der Muskulatur lokalisiert . . . . .	98
6.2	Die Ribokinase D-Rbks <sup>33E</sup> ist in <i>bubbles</i> <sup>33E-m</sup> mutiert und unterstützt die Relevanz von ATP-abhängigen Faktoren für die Myoblastenfusion . . . . .	99

6.2.1	Die RNA-Expression von D-Rbks <sup>33E</sup> lässt darauf schließen, dass es sich hierbei neben der muskelspezifischen Relevanz um ein ubiquitär exprimiertes Molekül handelt . . . . .	99
6.2.2	Die Rettung des mutanten Phänotyps zeigt eindeutig, dass D-Rbks <sup>33E</sup> in den Muskeln benötigt wird . . . . .	101
6.2.3	Die Basendeletion in <i>D-Rbks</i> <sup>bubbles33E-m</sup> führt zur Inaktivierung des Proteins und dadurch zu einer Null-Mutante, welche nicht mehr in der Lage ist, ATP zu hydrolysieren . . . . .	102
6.2.4	Wie könnte D-Rbks <sup>33E</sup> in die Prozesse der Muskelentwicklung von <i>Drosophila melanogaster</i> einzuordnen sein . . . . .	103
6.3	Das Ca <sup>2+</sup> -Bindepotein ist in den FCMs exprimiert und möglicherweise relevant für die Myoblastenfusion . . . . .	108
6.4	Ausblick . . . . .	111
<b>A</b>	<b>Anhang</b>	<b>113</b>
A.1	Tabelle der analysierten Gene, lokalisiert in 32F2-33A1 bzw. 33E1-33E3 und ausgewählte Charakteristika . . . . .	113
A.1.1	Region 32F2-33A1 . . . . .	113
A.1.2	Region 33E1-33E3 . . . . .	115
A.2	Die Aminosäuresequenzen der Ribokinase D-Rbks <sup>33E</sup> und <i>D-Rbks</i> <sup>bubbles33E</sup> . . . . .	116
A.3	Tabelle der Proteine vom Drosophila-Proteom mit EF-Hand Domänen . . . . .	117
A.4	Abkürzungen . . . . .	123
A.5	verwendete Konstrukte und Herstellung . . . . .	124
<b>B</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>125</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>137</b>

# 1 Zusammenfassung

Die EMS-induzierte Mutante *E832 (P3-106/2)* zeigt Störungen in der Entwicklung der somatischen und viszeralen larvalen Muskulatur in der Embryonalentwicklung von *Drosophila melanogaster* (Reichert 2004; Wierach 2005). Ziel der vorliegenden Arbeit war die weiterführende Analyse dieser Mutante, die Charakterisierung und Identifizierung des für den mutanten Phänotyp verantwortlichen Gens. Bei Komplementationsanalysen unter Zuhilfenahme von charakterisierten Deletionen zur Eingrenzung des Genortes zeigte sich, dass womöglich drei Letalmutationen in myogenese-relevanten Genen auf dem *E832*-Chromosom vorliegen. Aufgrund dieser Annahme wurde eine Entkopplung durchgeführt, um die Mutationen mit Hilfe von Rekombinations-Ereignissen zu trennen. Die resultierenden Fliegenstämme wurden mit Immunhistologie- und Komplementationstests analysiert. Zwei Regionen (32F1-33A2 und 33E1-33E3) konnten für einen somatischen Muskelphänotyp verantwortlich gemacht werden. Die Manifestierung des viszeralen Phänotyps erwies sich nach der Entkopplung als schwierig und somit lag der Schwerpunkt auf der Untersuchung der somatisch-relevanten Mutationen in der Region 33E1-33E3. Ein Großteil der in dieser Region liegenden Gene wurde anschließend kloniert, um mit Hilfe des UAS-Gal4-Systems Rettungs-Experimente durchzuführen. Ebenfalls konnte die mRNA-Expression mittels *in situ*-Hybridisierungen analysiert und zusammen mit den Rettungs-Experimenten einige Gene als Kandidaten für eine Relevanz in der Muskelentwicklung ausgeschlossen werden, weil Expressionsmuster in anderen Geweben wie Tracheen (CG31862) und Garlandzellen (CG31763 und *Pkd2*) erhalten wurden. Nur eines der Kandidatengene (CG17010) ist während der Mesoderm-Entwicklung exprimiert. Für CG17010 ist die Kodierungskapazität für eine Ribokinase annotiert und erhielt daher die Bezeichnung *D-Rbks<sup>33E</sup>*. *D-Rbks<sup>33E</sup>* (CG17010) zeigte eine Rettung des mutanten, somatischen Phänotyps in 33E1-33E3. Die mRNA dieses Gens ist in der Embryogenese weitestgehend ubiquitär exprimiert, wobei eine erhöhte Transkriptmenge im somatischen Mesoderm zu beobachten ist. Die Sequenzierung des mutierten Allels von *D-Rbks<sup>33E</sup>* ergab die Deletion einer Base. Auf Proteinebene führt dies zum Verlust der ATP-Binderstelle der *D-Rbks<sup>33E</sup>*. Erste immunhistologische Analysen zeigen, dass die Zelladhäsion in der Mutante korrekt verläuft und deshalb ein Defekt im nachfolgenden Prozess während der Myoblastenfusion vorliegen muss.

Auf der Suche nach weiteren möglichen fusionsrelevanten Proteinen wurde nach  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Faktoren und hier speziell nach  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindeproteinen gesucht. Es konnte ein Kandidat, *Kosh*, identifiziert werden. *In situ*-Hybridisierungen mit *kosh* ergaben durch die spezifische Expression erste Anhaltspunkte auf eine Funktion in den fusionskompetenten Myoblasten während der Fusion mit den Founderzellen. Somit ist *Kosh* eines der ersten Proteine, welches anzeigt, dass Kalzium neben einer physiologischen auch eine entwicklungsbiologische Rolle für die Muskulatur in *Drosophila* spielen könnte. Folglich wurden mit Hilfe vorliegender Untersuchungen zwei neue Komponenten aufgedeckt, welche in die Signalkaskaden der Myogenese einzugliedern sind.

## 2 Einleitung

### 2.1 *Drosophila melanogaster* als Modellorganismus der Entwicklungsbiologie

Die Taufliege *Drosophila melanogaster* ist ein genetisch gut zugänglicher Modellorganismus in der Entwicklungsbiologie. Sie hat vielfach dazu beitragen, Grundlagen konservierter Prozesse wie z. B. der Segmentierung zu analysieren und diese auf höher entwickelte Organismen zu übertragen. Die Entwicklung der synzytialen Muskelfasern durch Fusionen von spezifischen Zelltypen, den Myoblasten, ist ein Beispiel und hier wurden die wesentlichen Fortschritte in den letzten 15 Jahren erzielt. Der Vorteil der Nutzung liegt in der einfachen Verfolgung und Analyse der Determination, Differenzierung und anschließenden Fusion der Myoblasten während der Embryonalentwicklung. Desweiteren bieten sich in *D. melanogaster* verschiedene Möglichkeiten, um mit Röntgen-Bestrahlung oder Ethylmethansulfonat (EMS)-Mutagenese, Läsionen in das Genom der Fliege einzuführen. Dadurch sind, anhand phänotypischer Auswirkungen, Rückschlüsse auf die betroffenen Gene möglich. Außerdem kann eine Charakterisierung der Gene und ihrer Proteine mit Hilfe kreuzungsgenetischer, biochemischer und molekularbiologischer Techniken erfolgen und sich die Möglichkeit ergeben, diese Gene in Entwicklungskaskaden und Signalwege einzuordnen.

Das Genom von *D. melanogaster* wurde im Jahr 2000 vollständig sequenziert, mit etwa 13000 vorhergesagten Genen (Adams *et al.* 2000). Durch das kleine Genom können verschiedene Methoden zur Analyse von Genen herangezogen werden. Dazu gehören Insertionen von P-Elementen, als Möglichkeit, transgene Fliegen zu etablieren, welche die gezielte ektopische Expression von Genen erlauben. Eine Datenbank mit einer Vielzahl vorhergesagter Gene und ihrer postulierten Proteinfunktionen ist eine weitere wichtige Unterstützung ([www.flybase.org](http://www.flybase.org)).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung des EMS-mutierten Chromosoms von *E832* (P3-106/2), der Analyse der in der Mutante vorhandenen Phänotypen und die folgende Identifikation der betroffenen Gene im Mesoderm. In den folgenden Kapiteln werden daher die Grundlagen der Determination und Differenzierung des somatischen und viszerale Mesoderms erläutert und schließlich aufgrund der Identifikation einer *Drosophila*-spezifischen Ribokinase als neue Komponente der Muskelentwicklung eine Einleitung über Ribokinasen und ihre Rolle in Prokaryoten und Säugern gegeben. Zusätzlich begann die Untersuchung weiterer Faktoren mit möglicher Relevanz für die Myogenese, speziell der  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindeproteine, weshalb hier eine Einführung in die Themen Kalzium und Kalzium-enthaltenen Signalkaskaden erfolgt.

### 2.2 Die Determination des Mesoderms

Nach der Entstehung des Blastoderms bildet sich während der Gastrulation in etwa zeitgleich mit der Keimstreifverlängerung durch Invagination der ventralsten Zellen das Mesoderm. Die zunächst epithelialen Zellen nehmen ein mesenchymales Schicksal an, wandern nach dorsal unterhalb des Ektoderms und es bildet sich eine mesodermale, einzellige Schicht (Abmayr *et al.* 2005; Bate 1993). Die mesodermal exprimierten Transkriptionsfaktoren Twist und Snail sind für die Bildung die-

ses Keimblattes verantwortlich und der Fibroblasten-Wachstumsfaktor (Fibroblast growth factor - FGF)-Rezeptor Heartless aktiviert die dorsale Zellwanderung (Paululat *et al.* 1999; Michelson *et al.* 1998). Anschließend bilden sich aus dem einschichtigen Mesoderm durch ein komplexes Genexpressionsmuster die mesodermalen Derivate: das somatische und viszerale Mesoderm, das Herz und der Fettkörper (Riechmann *et al.* 1997). Die Paarregelgene *even-skipped* (*eve*) und *sloppy-paired* (*slp*) etablieren diese Bereiche. In der *eve*-Domäne entsteht dorsal das viszerale Mesoderm und ventral der Fettkörper, zusätzlich charakterisiert durch die Expression des Transkriptionsfaktors Serpent. In der *slp*-Domäne bilden sich dorsal die Herz-Vorläuferzellen und ventral das somatische Mesoderm. Dieser zweite Bereich ist gleichzeitig bestimmt durch eine hohe Expression des basischen Helix-Loop-Helix (bHLH)-Faktors Twist. Weitere Regulatoren wie die Segmentpolaritätsproteine Hedgehog (Hh), Engrailed (En), Decapentaplegic (Dpp) und Wingless (Wg) sind notwendig für die korrekte Ausbildung der Domänen entlang der Körperachsen (Riechmann *et al.* 1997). Dpp wird aus dem Ektoderm heraus für die restriktive Expression des Homeoboxgens *tinman* in den dorsalen Zellen entlang der Dorso-Ventral (DV)-Achse benötigt. So kann die viszerale Muskulatur, das Herz und die dorsalen somatischen Muskeln spezifiziert und gleichzeitig das Homeoboxgen *bagpipe* aktiviert werden, welches für die Entwicklung viszeraler Muskeln essentiell ist (Frasch 1995; Bodmer 1993; Azpiazu & Frasch 1993).

## 2.3 Die Differenzierung des Mesoderms

Die somatische Muskulatur besteht aus 30 individuellen Muskeln je abdominalem Hemisegment, welche durch ihre Größe, Form und Orientierung, ihre Anheftung an die Epidermis, die Innervierung mit Motoneuronen und ihre Position in der Larve charakterisiert sind (Bate 1993). Baylies *et al.* beschrieben 1998 eingehend in einem Übersichtsartikel die aufeinanderfolgenden Schritte in der Entwicklung des Muskelmusters (siehe Abb. 1, Baylies *et al.* 1998). Innerhalb der *slp*-Domäne bilden sich, aktiviert durch ektodermale Signale von Wg und Dpp, Äquivalenzgruppen durch die Expression des proneuralen Gens *lethal of scute* (*l'sc*) (Baylies & Bate 1996; Carmena *et al.* 1995, 1998a; Riechmann *et al.* 1997). Der Notch-Delta-Signalweg vermittelte Mechanismus der lateralen Inhibition beschränkt in jeder Äquivalenzgruppe die Expression von *l'sc* auf eine Zelle. Diese Zelle nimmt dadurch das Schicksal einer Progenitorzelle an, während sich die restlichen Zellen zu fusionskompetenten Myoblasten (fusion competent myoblasts - FCMs) spezialisieren (Abb. 1, Baylies *et al.* 1998; Abmayr *et al.* 2005). Es wird vermutet, dass jede Äquivalenzgruppe einen charakteristischen Progenitortyp hervorbringt, welcher durch extrinsische und intrinsische Signale in der Identität bestimmt ist, unter anderem erkennbar durch die Expression von Transkriptionsfaktoren. Wingless ist z. B. als induktives Signal aus dem Ektoderm für die Expression von Transkriptionsfaktoren wie S59 in einigen Progenitoren notwendig (Baylies *et al.* 1995).

Nach der Spezifikation der Progenitoren teilen sich diese Zellen asymmetrisch und bilden entweder zwei larvale Gründerzellen (FC - Founder cell) oder eine FC und einen adulten Muskelvorläufer oder eine FC und eine Herzzelle (Abb. 1, Carmena *et al.* 1995; Crozatier & Vincent 1999; Jagla *et al.* 1998; Park *et al.* 1998; Carmena *et al.* 1998b). Aus Analysen des Nervensystems ist bekannt, dass

durch die asymmetrische Teilung Zellen verschiedene Zell-Schicksale annehmen können und dies ist bereits zum Teil ebenfalls in den Prozessen während der Myogenese beschrieben. Die Tochterzellen eines Progenitors differenzieren in unterschiedliche Zelltypen, entsprechend der jeweiligen Expression von Identitätsgenen wie z. B. Eve oder Krüppel (Ruiz-Gomez & Bate 1997; Carmena *et al.* 1998b). Dies erfordert eine bestimmte Zellpolarität, welche die ungleiche Verteilung von zellulären Faktoren wie z. B. Numb (Nb) gewährleistet (Jan & Jan 1998). Numb ist ein membranassoziertes Protein und interagiert mit Notch (Uemura *et al.* 1989; Guo *et al.* 1996). Wird Numb überexprimiert, so erhalten beide Tochterzellen die gleiche Zellidentität, während aus *numb*-Mutanten die gegenteilige Zellidentität resultiert. Die Rolle von Numb im Mesoderm spricht für die Existenz von zellautonomen Mechanismen der asymmetrischen Zellteilung, wonach je nach Verteilung der intrinsischen Faktoren die verschiedenen FC-Schicksale resultieren.

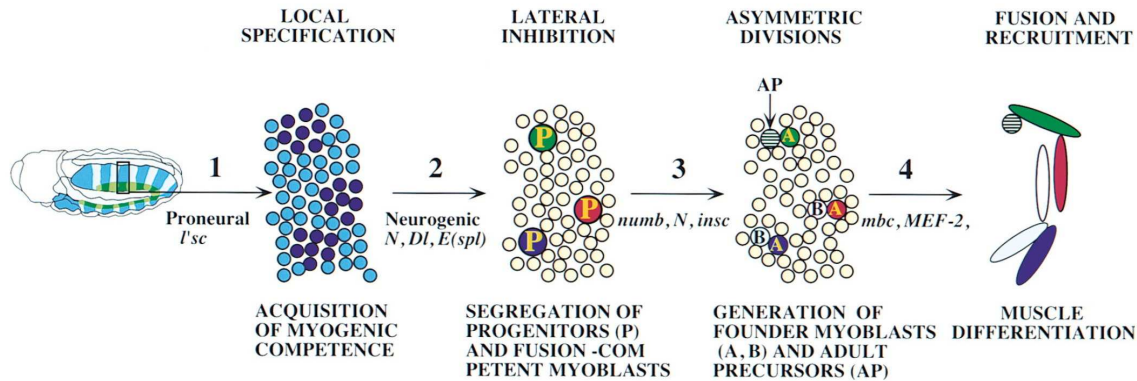


Abbildung 1: **Die Entstehung der Muskeln vollzieht sich in mehreren Schritten.** (1) *l'sc* wird in den Bereichen einer hohen Twist-Konzentration exprimiert. Diese Zellen erhalten die Kompetenz zur Bildung eines Muskel-Progenitors. (2) Neurogene Proteine segregieren durch den Mechanismus der lateralen Inhibition einen Progenitor aus der Äquivalenzgruppe, während die restlichen Zellen zu FCs werden. (3). Anschließend teilen sich die Progenitor asymmetrisch und können entweder zwei unterschiedliche FCs oder eine FC und einen Progenitor für die adulte Muskulatur (AP) bilden. (4) Schließlich fusionieren die umliegenden fusionskompetenten Myoblasten mit den FC und bilden je nach FC-spezifischer Genexpression individuelle Muskeln (Entnommen aus Baylies *et al.* 1998).

Die FC beinhaltet die Information für die Identität der individuellen Muskeln und dadurch die Entstehung der fertigen Muskulatur durch die Differenzierung in die verschiedenen Muskeltypen. Die hierfür verantwortlichen Proteine sind unter anderem Transkriptionsfaktoren wie Nautilus, S59, Krüppel, Runt und Even skipped (Abb. 1, Michelson *et al.* 1990; Dohrmann *et al.* 1990; Gaul *et al.* 1987; Frasch 1995; Kania *et al.* 1990). So ist z. B. Even-skipped als Marker zunächst in der FC des DA1-Muskels vorhanden, während Runt die FCs des DO2-Muskels markiert. Die Kerne der bereits fusionierten FCs beginnen anschließend ebenfalls den jeweiligen Transkriptionsfaktor zu



exprimieren, so dass Fusionen mit Hilfe dieser Marker verfolgbar sind (Ruiz-Gomez & Bate 1997; Kosman *et al.* 1998). In den fusionskompetenten Myoblasten wird, reguliert durch die Faktoren Twist und D-Mef2, der Transkriptionsfaktor *Lame duck*/Myoblast incompetent/Gleeful (*Lmd*/*Minc*/*Glee*) exprimiert (Furlong *et al.* 2001). *Lmd* kontrolliert die Identität der FCMs. In *lmd*-Mutanten ist keine *Sns*-Expression mehr zu beobachten, welches charakteristisch in den Wildtyp-FCMs vorhanden ist (Duan *et al.* 2001; Ruiz-Gomez *et al.* 2002; Furlong *et al.* 2001). Die FCMs, auch „naive Population“ genannt, nehmen nach erfolgter Fusion die FC-Identität an und legen sich so auf die Bildung einer spezifischen Myotube fest (Baylies *et al.* 1998). Diese Neuprogrammierung der FCMs erfordert deshalb den Abbau FCM-spezifischer Faktoren, wie dies z.B. für *Lame duck* und dessen Abbau durch *Mind bomb 2* postuliert wird (Carrasco-Rando & Ruiz-Gomez 2008). Die heterologe Zelladhäsion zwischen FCMs und FCs ist eine wichtige Voraussetzung, um eine Fusion durchführen zu können. Eine homologe Zelladhäsion kommt in der Regel nicht vor (Frasch & Leptin 2000).

## 2.4 Die Entwicklung der vizeralen Muskulatur

Die viszerale Muskulatur umgibt, mit den zirkulären und longitudinalen Muskeln, den Darm und ist für dessen Kontraktionen verantwortlich (Abb. 2). Die zirkuläre Muskulatur umspannt alle drei Regionen des Darms, den Vorder-, Mittel- und Hinterdarm, während sich die longitudinale Muskulatur nur im Mitteldarmbereich befindet.

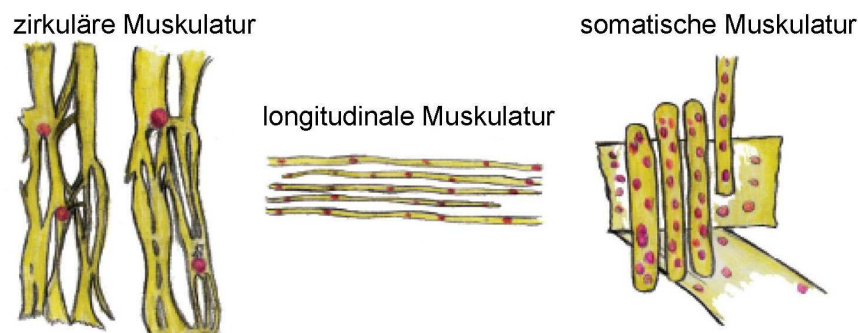


Abbildung 2: **Drei larvale Muskeltypen von *Drosophila melanogaster*.** Eine schematische Darstellung zeigt die zirkulären (links) und longitudinalen viszerale Muskeln (mitte) und die somatische Körperwandmuskulatur (rechts). Dabei ist die Struktur der binukleären zirkulären Muskeln zu erkennen, welche mit den multinukleären longitudinalen Muskeln ein verwobenes Netzwerk bilden (entnommen aus Schröter *et al.* 2006).

Die Entstehung der zirkulären Muskulatur wird durch die Expression von *tinman* (*tin*) und *bagpipe* (*bap*) bestimmt. Im Bereich der Eve-Domäne wird unter Beteiligung von Dpp Tin aktiviert, welches wiederum *bap* reguliert (Azpiazu & Frasch 1993; Bodmer 1993; Yin & Frasch 1998; Riechmann *et al.* 1997). Klapper *et al.* widerlegten in Transplantationsexperimenten, dass longitudinale und zirkuläre Muskeln mononukleär sind, vielmehr entstehen sie wie im Übrigen die somatische Muskulatur, aus der Fusion von FCs und FCMs, wobei die zirkuläre Muskulatur nur eine unvollständige Fusion einer FC mit einer FCM durchführt. Dabei bleiben zytoplasmatische Brücken zwischen den Zellen

bestehen (Klapper *et al.* 2001; Schröter *et al.* 2006). Daraus entsteht die fibrilläre Struktur der binukleären zirkulären Muskeln, welche sich mit den longitudinalen Muskeln zu einer Art Netzwerk zusammenfügen (Abb. 2, Schröter *et al.* 2006).

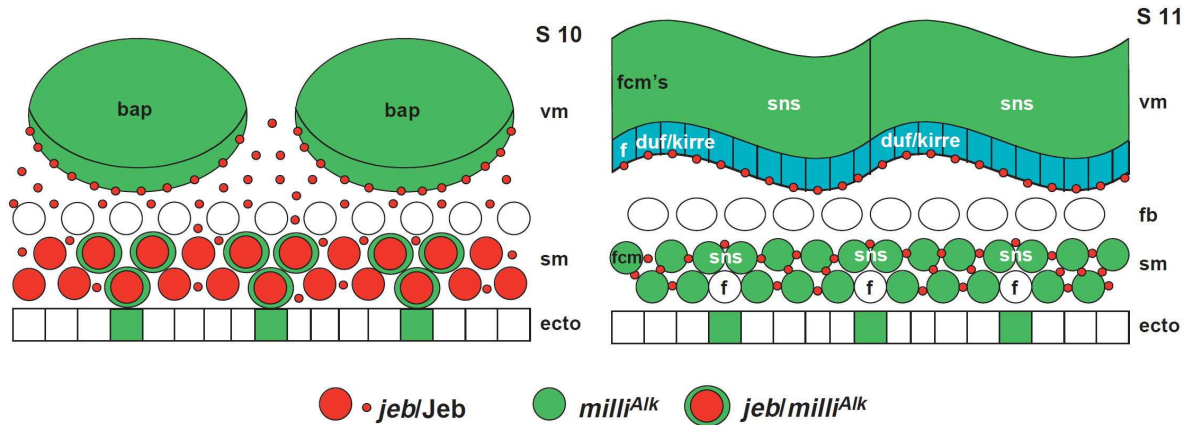


Abbildung 3: **Der Jeb-Alk Signalweg.** In Stadium 10 (S10) exprimieren die ventro-medialen somatischen Precursorzellen *jelly belly* (*jeb*, rote Kreise) und sekretieren das Jeb-Protein (rote Punkte). Einige dieser Zellen exprimieren neben *jeb* zusätzlich *milli<sup>alk</sup>* (rot mit grüner Umrandung). Alle viszeralen zirkulären Progenitor-Zellen exprimieren *milli<sup>alk</sup>* und *bagpipe* (*bap*). Die Jeb-Signalkaskade und die Aktivierung in den viszeralen FCs hängt von der Menge des sekretierten Jeb-Proteins ab. In Stadium 11 (S11) führt diese Aktivierung zu der Expression von *dumbfounded/kin of irre* (*duf/kirre*, blau) in den viszeralen Foundern (*f*), während die FCMs (*fcm*) ohne aktive Signalkaskade durch eine *sticks and stones* (*sns*) Expression charakterisiert sind. Im somatischen Mesoderm wird die *jeb*-Expression hauptsächlich in den *lame duck*-exprimierenden FCMs aufrechterhalten. Im Fettkörper (*fb*) und Ektoderm (*ecto*) gibt es bisher keine Information über die Rolle von Jeb und *Milli<sup>Alk</sup>* (entnommen aus Stute *et al.* 2004).

Die FCs der zirkulären und longitudinalen Muskeln werden an unterschiedlichen Orten determiniert. Die Zellen der zirkulären Muskulatur wandern aus dem 'viszeralem Rumpfmesoderm' (Trunk Visceral Mesoderm - TVM) in der Rumpfregion nach innen, bilden entlang der longitudinalen Achse zwei parallele Zellreihen und nehmen dabei eine palisadenartige Form an (Campos-Ortega & Hartenstein 1997). Die FCs der longitudinalen Muskulatur besitzen ihren Ursprung in der posterioren Region des Mesoderms, dem 'kaudalen viszeralem Mesoderm' (Caudal Visceral Mesoderm - CMV). Sie bewegen sich in zwei bilateral symmetrischen Zellgruppen zwischen der inneren Oberfläche des somatischen Mesoderms und dem Darm nach anterior (Tepass & Hartenstein 1994; Georgias *et al.* 1997). Schließlich erfolgt eine longitudinale Streckung entlang der anterior-posterioren (AP)-Achse, an der sich die Zellen linear anordnen. Diese Zellen exprimieren bHLH54 und das Homeodomänenprotein Zfh1 (Georgias *et al.* 1997; Brohier *et al.* 1998). Alle FCMs des viszeralem Mesoderms stammen aus dem TVM.

Jelly Belly (Jeb) und Alk, detektiert über das Allel *Milliways<sup>Alk</sup>* (*Milli<sup>alk</sup>*), sind weitere Faktoren, die für die Determination der Zelltypen im viszeralem Mesoderm wichtig sind (Weiss *et al.* 2001; Englund

*et al.* 2003; Stute *et al.* 2004). Alk ist ein *Drosophila* Homolog der membran-spannenden Anaplastic Lymphoma Kinase (Alk) und notwendig für die interzelluläre Kommunikation, Proliferation und Differenzierung (Englund *et al.* 2003; Loren *et al.* 2003). Jeb wird im somatischen Mesoderm synthetisiert, dort sekretiert und vom viszeralem Mesoderm aufgenommen (Abb. 3; Weiss *et al.* 2001). Den Nullmutanten dieser Gene fehlen die FCs für die zirkuläre viszerale Muskulatur und es wird angenommen, dass die Genprodukte für die Determination dieser FCs zuständig sind (Englund *et al.* 2003).

Die ventralsten Zellen des viszeralen Mesoderms erhalten aufgrund ihrer Lage die höchste Konzentration an Jeb und da sie als viszerale Zellen den Jeb-Rezeptor Alk exprimieren, ist hier der RTK-Signalweg aktiviert. Das führt zur Expression von *dumbfounded/kin of irre* (*duf/kirre*) in der äußeren Zellreihe und dies determiniert diese Zellen zu FCs der viszeralen Ringmuskulatur (Englund *et al.* 2003). Neben *duf/kirre* sind noch weitere Gene im viszeralem Mesoderm exprimiert, die auch bei der Fusion in der somatischen Muskulatur notwendig sind, wie z. B. *myoblast city* (*mbc*) und *sticks and stones* (*sns*) (siehe hierzu Kapitel 2.5, (Erickson *et al.* 1997; Bour *et al.* 2000; San-Martin *et al.* 2001; Klapper *et al.* 2002). Dies zeigt Parallelen der Prozesse des viszeralen und somatischen Mesoderms, was von dem 'Jeb/Alk'-Signalweg unterstützt wird. In *jeb*-Mutanten ist keine Differenzierung der somatischen FCs zu beobachten. Stattdessen rekrutieren die somatischen FCs die viszeralen FCs zur Fusion (Stute *et al.* 2004).

Das viszerale Mesoderm umschließt zum Ende der Embryogenese das Endoderm und es ist mittlerweile bekannt, dass induktive Signale durch die verschiedenen Keimblätter hindurch für die Entwicklung des Endoderms notwendig sind (Tam *et al.* 2003) und umgekehrt ist das Endoderm für die Differenzierung des viszeralen Mesoderms relevant (Wolfstetter *et al.* 2009). Homeotische Gene wie z. B. *ultrabithorax* (*ubx*) zeigen sich als wichtig für die Morphogenese des larvalen Mitteldarms aus dem viszeralem Mesoderm heraus (Bienz 1994). So sekretiert das viszerale Mesoderm Signalmoleküle in das darunterliegende Mitteldarm-Endoderm, wo z. B. *labial* aktiv ist, um bestimmte Zelltypen die sogenannten Kupferzellen des Mitteldarms zu differenzieren (Bienz 1997). Unter anderem durch Aktivitäten des TGF $\beta$ -Signalweges (transforming growth factor) schnürt sich mit den Konstriktionen schließlich der Darm, wobei wahrscheinlich FoxK als TGF $\beta$ -Zielfaktor für die Bildung der Konstriktionen notwendig ist (Casas-Tinto *et al.* 2008).

## 2.5 Die Entwicklung der somatischen Muskulatur

### 2.5.1 Die Fusion der Myoblasten erfolgt in zwei Schritten

Die somatische Myogenese erfolgt in zwei aufeinanderfolgenden, voneinander zu unterscheidenden Fusionschritten (zusammengefasst in Oenel & Renkawitz-Pohl 2009). Während des ersten Schritts ab Stadium 11 finden Fusionen der FCs mit zwei bis drei FCs statt, wobei mehrkernige Precursor-Zellen entstehen (Bate 1990; Bate *et al.* 1993). Anschließend erfolgen ab Stadium 14/15 im zweiten Schritt weitere Fusionen der Precursor-Zellen mit FCs zu einer fertigen Myotube (Abb. 4; zusammengefasst in Oenel & Renkawitz-Pohl 2009). Daran anschließend heften sich die fertigen Myotuben

an die Epidermis an und der Aufbau der Sarkomere des Muskels als funktionelle Einheit schließt die Entwicklung der somatischen Muskulatur (Kreisköther *et al.* 2006).

Die ultrastrukturellen Eigenschaften und molekularen Faktoren in der Myoblastenfusion sind bereits in der Vergangenheit untersucht worden, es fehlen aber noch viele wesentliche Aspekte zum Verständnis. Bisher wurden primär Zelladhäsionsmoleküle und Aktin-Regulatoren analysiert. Viele Fragen, insbesondere Abläufe an den fusionierenden Membranen sind ungeklärt. In der somatischen Myogenese ist vor der eigentlichen Fusion die heterologe Zelladhäsion zwischen der FC und der FCM Voraussetzung, was zu einer lokalen F(filamentöser)-Aktin-Anreicherung und zum Aufbau eines Komplexes fusionsrelevanter Faktoren an der Fusionsstelle führt (Kesper *et al.* 2007; Kim *et al.* 2007; Richardson *et al.* 2007). Dieser Komplex, als 'Fusion-Restricted Myogenic Adhesive Structure' (FuRMAS) bezeichnet, ist eine ringähnliche Anordnung von Zelladhäsionsmolekülen mit ihren Interaktionsmolekülen sowie einer zentralen F-Aktin-Akkumulation an der Fusionsstelle der Myoblasten (Kesper *et al.* 2007). FuRMASs besitzen eine Signalzentrumseigenschaft und eignen sich deshalb, um weitere fusionsrelevante Faktoren an ihren Wirkort zu rekrutieren (Oenel & Renkawitz-Pohl 2009). Es ist bekannt, dass F-Aktin und D-Titin in FCs bzw. wachsenden Myotuben in den Foci akkumulieren, während Blow in den FCMs angereichert wird (Kesper *et al.* 2007; Richardson *et al.* 2007). Außerdem zeigen FuRMASs transiente membran-assoziierte Eigenschaften, welche für immunologische Synapsen, Podosomen und Invadopodien bereits beschrieben sind (Kesper *et al.* 2007; Oenel & Renkawitz-Pohl 2009).

Anhand von Mutanten war es möglich, zahlreiche molekulare Komponenten der Myoblastenfusion zu identifizieren. Die Zell-Zell-Erkennung und initiale Zelladhäsion sind abhängig von zwei Mitgliedern der Immunoglobulin-Superfamilie: Dumbfounded/Kin of Irre (Duf/ Kirre) und Sticks-and-stones (Sns) (Abb. 4 und 5; Ruiz-Gomez *et al.* 2000; Bour *et al.* 2000). Duf/Kirre wird in den FCs und Sns in den FCMs exprimiert. Die FCMs in *sns*-Nullmutanten bilden keine Filopodien in Richtung der Founder aus, daher findet weder die Zellerkennung noch eine anschließende Fusion statt (Bour *et al.* 2000). Duf/Kirre wird als Chemoattraktant bezeichnet und in einem Attraktions-Assay konnte gezeigt werden, dass sich die Filopodien von FCMs in einem *duf*-mutanten Hintergrund zu einer ektopischen Duf/Kirre-Expression ausstrecken können (Ruiz-Gomez *et al.* 2000). Mit Koimmunopräzipitations-Assays konnte eine Interaktion der extrazellulären Domänen von Duf/Kirre mit Sns in Schneiderzellen gezeigt werden (Galletta *et al.* 2004). Gleichwohl ist hier noch zu klären, ob Duf/Kirre als membranständiges Molekül agiert oder ob ein Teil der extrazellulären Domäne sekretiert wird. Für beide Faktoren existieren Homologe bzw. Paraloge. Das Homolog von Sns ist Hibris (Hbs) und exprimiert sowohl in FCs und FCMs. Da *hbs*-Mutanten nur geringe Defekte in der Myoblastenfusion zeigen, ist Hbs allein für die Myogenese nicht essentiell. Aufgrund von Überexpressionsstudien wird Hbs eine antagonistische Funktion zu Sns zugesprochen, obwohl eine funktionelle Redundanz wahrscheinlich ist, was anhand von Ergebnissen von Doppelmutanten-Analysen untersucht wurde (Abb. 5; Dworak *et al.* 2001; Artero *et al.* 2001; Menon *et al.* 2005; Shelton *et al.* 2009).

Roughest/IrregularChiasm (Rst/IrreC) ist ein Paralog zu Duf/Kirre und ist wie Hbs in FCs und

FCMs exprimiert. Rst/IrreC ist ebenfalls ein Mitglied der Immunoglobulin-Superfamilie und kann FCs sowie FCMs anziehen (Abb. 5; Strütkelnberg *et al.* 2001). Einzelmутanten von *duf/kirre* bzw. *rst/irreC* zeigen keine Fusionsstörung, nur in Doppelmutanten ist ein Defekt zu beobachten (Strütkelnberg *et al.* 2001). Duf/Kirre und SNS sind ringförmig in den FuRMAss an den Kontaktstellen der FCs bzw. wachsenden Myotuben mit den FCMs verteilt (Kesper *et al.* 2007).

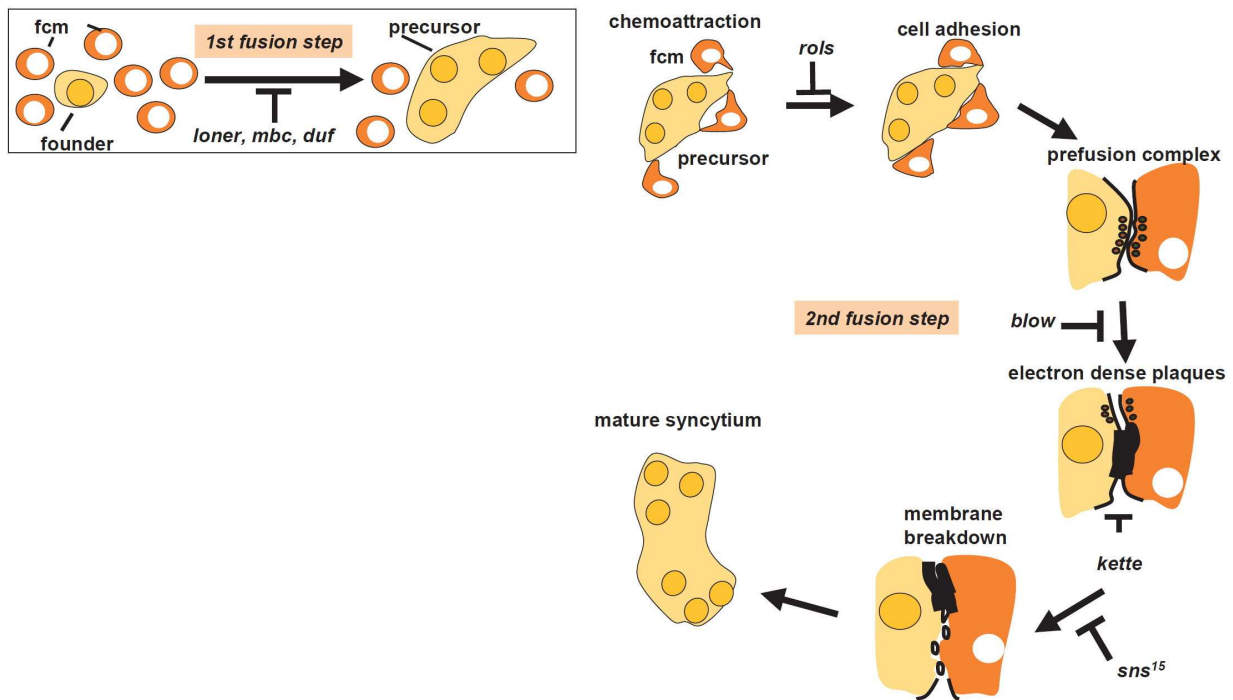


Abbildung 4: **Das Modell der zweistufigen Myoblastenfusion.** Die Zell-Zell-Erkennung ist durch die Expression von Duf in den FCs/Precursor-Zellen (gelb) und SNS in den FCMs (orange) vermittelt. Der erste Fusionschritt (links) ist abhängig von Mbc und Schizo/Loner, während der zweite Schritt (rechts) charakterisiert ist durch die Bildung von Strukturen wie den Präfusionskomplex, den elektronendichten Plaques und den lokalen Membranbrüchen. Dies benötigt Faktoren wie Blow, Rols und Kette. Mutanten stoppen zu unterschiedlichen Zeiten, wie z. B. *sns<sup>15</sup>* kurz vor dem Membranzusammenbruch (entnommen aus Schröter *et al.* 2004).

Nach der ersten Erkennung und Adhäsion der Myoblasten müssen Signale von der Membran in das Zytoplasma transferiert werden, um den Fusionsprozess zu initiieren. Hier spielen die zytoplasmatischen Domänen der Adhäsionsmoleküle eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion (Sink 2006; Abmayr *et al.* 2008). Die intrazelluläre Domäne von Duf/Kirre ist z. B. notwendig für die Rekrutierung des Multidomänen-Proteins Rolling pebbles 7 (Rols7), was zu einer Kolo-kalisation von Rols und Duf/Kirre in einer Ringstruktur in den FuRMAss auf der Seite der FCs bzw. wachsenden Myotube führt (Abb. 4; Rau *et al.* 2001; Chen & Olson 2001; Menon *et al.* 2005; Kesper *et al.* 2007). Immunopräzipitations-Analysen zeigten, dass Rols7 mit Duf/Kirre und wahrscheinlich auch

mit Mbc interagieren kann, was zur Vermutung führt, dass Rols als Vermittlungsmoleküle zwischen der Membran und dem Aktin-Zytoskelett über Mbc und Rac agieren kann (Chen & Olson 2001). Während die Ankyrin-Repeats von Rols7 essentiell sind für die Rekrutierung von Rols an die Membran, so interagieren die TPR-Repeats mit Duf/Kirre (Menon *et al.* 2005; Kreisköther *et al.* 2006). Rols7 scheint ebenfalls für die Rekrutierung von D-Titin an die Fusionsstelle relevant zu sein (Menon & Chia 2001).

Myoblast city (Mbc), ein Guanin-Austauschfaktor (Guanine-Exchange Factor - GEF), lokalisiert in FuRMAS in den FCs und FCMs zusammen mit den F-Aktin-Foci (Richardson *et al.* 2007). *mbc*-Mutanten zeigen keinerlei Fusionen und die Filopodien der FCMs sind nicht zielgerichtet. Es wird somit während des ersten Fusionsschritts benötigt (Abb. 4 und Abb. 5). Mbc ist ein Homolog des humanen DOCK180 und besitzt eine SH3-Domäne am N-Terminus, welche wahrscheinlich für die G-Protein-vermittelte Signaltransduktion verantwortlich ist und somit Mbc zu einem Adapterprotein für die Weiterleitung der Signale qualifiziert (Erickson *et al.* 1997; Rushton *et al.* 1995). Mbc interagiert mit dem Ras-MAPK-aktivierenden Adapterprotein Crk und kann als GEF die GTPasen Rac1 und Rac2 in ihre aktive Form überführen und folglich die Organisation des Zytoskeletts beeinflussen (Abb. 5; Galletta *et al.* 2004; Erickson *et al.* 1997; Geisbrecht *et al.* 2008).

Schizo/Loner ist wie Mbc ein GEF, der relevant ist für die Adenosin-Ribosylierungsfaktor (Arf)-Familie von GTPasen und somit ein weiteres Signalmolekül in FCs bzw. wachsenden Myotuben und FCMs darstellt (Abb. 5). *schizo/loner*-Mutanten zeigen einen starken Fusionsphänotyp (Chen *et al.* 2003). *In vitro*-Assays indizieren eine Bindung mit Arf6 (Chen *et al.* 2003), wobei *arf6*-Mutanten allerdings ein Wildtyp-Muskelmuster zeigten (Dyer *et al.* 2007). Dies deutet darauf hin, dass Arf6 nicht die einzige Arf-GTPase ist, welche von Schizo aktiviert wird. Schizo scheint keine bedeutende Funktion in den FuRMASs zu besitzen, da Schizo außerhalb der F-Aktin-Foci und nicht an den angrenzenden Membranen zwischen FCMs und FCs exprimiert ist (Richardson *et al.* 2007). Die genaue Rolle von Schizo ist bisher noch unbekannt.

Für FCMs konnte bisher noch kein Signalmolekül identifiziert werden, welches die Signaltransduktion in das Zytoplasma vermittelt. Ein Anknüpfungspunkt wäre SNS, da der zytoplasmatische Teil mehrfach redundante Domänen besitzt. Es muss aber eine andere Signalkaskade als in den FCs angenommen werden (Kocherlakotka *et al.* 2008).

Die Dynamik der F-Aktin-Foci in den FuRMASs benötigt Faktoren für die Aktin-Polymerisierung und -Depolymerisierung. Es wird durch Mutationen in Genen von Aktin-Regulatoren deutlich, dass die präzise Regulation von F-Aktin für die Myoblastenfusion notwendig ist (Abb. 5; Schröter *et al.* 2004; Kesper *et al.* 2007; Kim *et al.* 2007; Richardson *et al.* 2007; Massarwa *et al.* 2007; Berger *et al.* 2008).

Die Familie der Aktin-verwandten Proteine (actin related proteins - ARPs) und hier besonders der Komplex bestehend unter anderem aus Arp2 und Arp3 initiiert die Bildung neuer F-Aktin-Filamente durch die Verankerung neuer Filamente an bereits existierende Aktin-Netzwerke (Pollard 2007). Die Regulation des Arp2/3-Komplexes unterscheidet sich sowohl in FCs und FCMs sowie während des ersten und zweiten Fusionsschritts. Rho, Rac und Cdc42 sind kleine GTPasen und in

Aktin-abhängige Prozesse involviert (Etienne-Manneville & Hall 2002). Während Cdc42 keine Rolle in der Myoblastenfusion zu haben scheint (Schäfer *et al.* 2007), ist Rac ein wichtiger Faktor, wie dies bereits im Zusammenhang mit Mbc dargestellt ist. Rac1 und Rac2 sind zusammen mit Kette die ersten Aktin-Regulatoren, welche im Zusammenhang mit der Myoblastenfusion in *Drosophila* beschrieben wurden (Luo *et al.* 1994; Doberstein *et al.* 1997; Hakeda-Suzuki *et al.* 2002; Schröter *et al.* 2004).

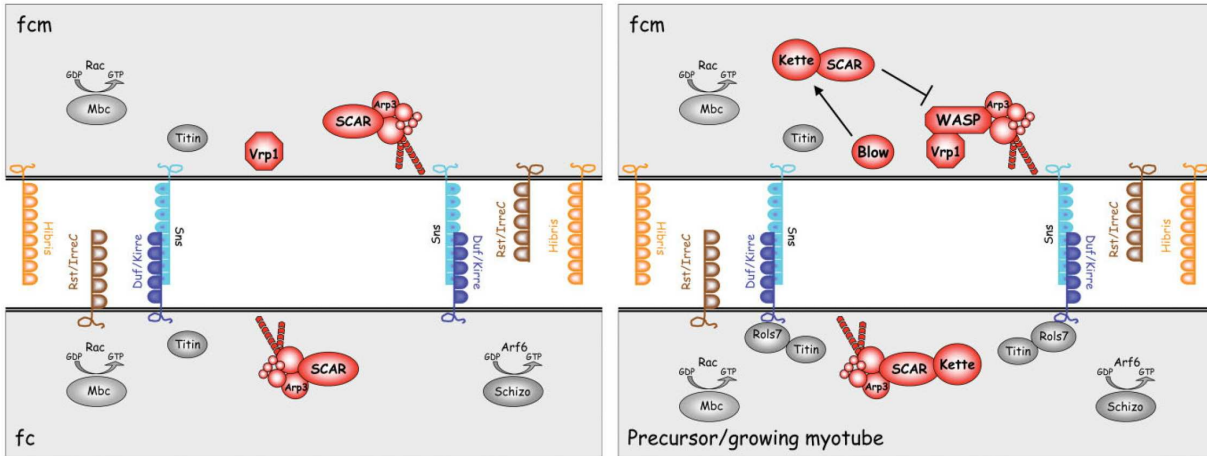


Abbildung 5: **Die Regulation von F-Aktin während der Myoblastenfusion.** Der Arp2/3-Komplex ist durch verschiedene F-Aktin-Regulatoren während des ersten und zweiten Fusions-schrittes aktiviert. Die Adhäsionsmoleküle Sns und Duf/Kirre initiieren eine Signalkaskade, welche in der Aktivierung des SCAR/WAVE-Komplexes und Verprolin1 (Vrp1) während des ersten Schrittes resultiert (links). Intrazelluläre Komponenten, wie die GEFs Mbc und Schizo/Loner und die GTPasen Rac1 und Rac2, sind wahrscheinlich an der Signalweitergabe beteiligt. Mutationen dieser Genen führen zu einer Unterbrechung der Fusion vor der Entstehung von Precursor-Zellen. Die Signalkaskaden während des zweiten Fusions-schrittes beinhalten die Aktivität von Rols7 in Precursor-Zellen und Blow in FCMs (rechts). Zusätzlich zum SCAR/WAVE-Komplex wird der WASP/Vrp1-Komplex in den FCMs aktiviert. Es ist bisher unklar, ob Mbc und Schizo/Loner hier ebenfalls von Bedeutung sind. In Rot dargestellt sind die Aktin-Regulatoren (entnommen aus Oenel & Renkawitz-Pohl, 2009).

*kette* interagiert genetisch mit dem FCM-spezifisch exprimierten Gen *blown fuse* (*blow*; Schröter *et al.* 2004). *kette*-Mutanten arretieren die Myogenese kurz nach *blow*-Mutanten, wobei elektronendichte Plaques mit aberranter Morphologie sichtbar sind, aber kein Membranabbau mehr stattfinden kann (Schröter *et al.* 2004). *blow*, auf Seiten der somatischen FCMs exprimiert, reguliert möglicherweise die Entwicklung der elektronendichten Plaques, ein Vorgang, welcher später näher beschrieben wird (Doberstein *et al.* 1997; Schröter *et al.* 2006).

Die Rac-GTPase und das Vertebratenhomolog von Kette, Nap1/Nap-125, sind in die Aktivierung von SCAR/WAVE, einem Regulator des Arp2/3-Komplexes involviert. Für Vertebraten ist beschrieben, dass ein Komplex inklusive Nap-125 SCAR/WAVE inaktiv hält, während die Bindung von Rac aktivierend wirkt. Somit ist SCAR/WAVE in der Lage, den Arp2/3-Komplex zu aktivieren (Abb.



5; Takenawa & Suetsugu 2007). Für *Drosophila* ist anzunehmen, dass Kette in der Lokalisation von SCAR/WAVE involviert ist (Richardson *et al.* 2007), aber alternativ wird postuliert, dass Kette inhibitorisch auf WASP wirkt (Schäfer *et al.* 2007; Oenel *et al.* 2010).

Das Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein (Wiskott-Aldrich syndrome protein - WASP) ist neben SCAR/WAVE auch während der Myoblastenfusion notwendig. Das Allel *wasp*<sup>3D3-035</sup> ist eine dominant-negative Mutante und zeigt die Wichtigkeit dieses Faktors in der Myoblastenfusion (Schäfer *et al.* 2007). Doppelmutanten von *arp3* und *wasp* haben eine Funktion von WASP während des zweiten Fusionssteps aufgezeigt (Massarwa *et al.* 2007; Berger *et al.* 2008) und Zelltyp-spezifische Rettungsexperimente zeigten keine relevante Funktion in den FCs, aber in den FCMs, da mit SNS-Gal4 getriebenes UAS-WASP den *wasp*<sup>3D3-035</sup>-Phänotyp retten konnten (Schäfer *et al.* 2007, pers. Kommunikation G. Schäfer). Es ist bekannt, dass WASP mit Verprolin1 (Vrp1/Solitary) interagiert (Abb. 5). Kim und Kollegen zeigten, dass Embryonen eines *vrp1*-Allels nach der Bildung der Präfusionskomplexe arretieren (Kim *et al.* 2007), während Massarwa und Kollegen allerdings eine Vesikulierung der Membran in *vrp1*-Mutanten beobachten konnten (Massarwa *et al.* 2007). Infolge der Auswertungen von *scar/wave;vrp1*-Doppelmutanten konnte keine Fusion gezeigt werden, so dass anzunehmen ist, dass SCAR/WAVE und Vrp1 die erste Fusionsphase kontrollieren, während SCAR/WAVE, WASP und Vrp1 sich für die zweite Fusionsphase notwendig zeichnen, allerdings stehen hier noch endgültige Nachweise aus (Abb. 5; Berger *et al.* 2008). Der Arp2/3-Komplex wird im ersten Fusionsschritt wahrscheinlich WASP-unabhängig aktiviert. Es wird angenommen, dass eventuell D-Wip mit Cortactin interagieren kann, um Aktin-Polymerisierung über den Arp2/3-Komplex im ersten Fusionsschritt zu induzieren (Kinley *et al.* 2003). Eine kürzlich identifizierte Arp3-Mutante (*arp3*<sup>schwächling</sup>) stoppt während der Fusion nach bereits erfolgter Membran-Vesikulierung und der Ausbildung einer Fusionspore. Die FCM integriert allerdings nicht in die wachsende Myotube (Berger *et al.* 2008). Da *wasp* und *vrp1* Mutanten während der Vesikularisierung stoppen (Massarwa *et al.* 2007; Berger *et al.* 2008), wird angenommen, dass die Erweiterung der Fusionspore von der Arp2/3-vermittelten F-Aktin-Verzweigung abhängig ist.

### **2.5.2 Der zweite Schritt der somatischen Fusion kann in ultrastrukturell auflösbare Abschnitte gegliedert werden**

Ultrastrukturelle Analysen von Transmissions-Mikroskopie-Aufnahmen, beschrieben in Doberstein *et al.*, zeigen die molekularen Eigenschaften der Fusion während des zweiten Schrittes. Hier konnten distinkte membran-assoziierte elektronendichte Strukturen, die Präfusionskomplexe und elektronendichte Plaques und eine anschließende Membran-Vesikulierung gezeigt werden (Abb. 4 und Abb. 6; Doberstein *et al.* 1997). Der Präfusionskomplex besteht aus einer variablen Anzahl von Vesikeln (bis zu 15) mit je einem Durchmesser von 40 nm. Es ist möglich, dass der Komplex durch den Transport von Vesikeln entlang von F-Aktin an die Membranen zustande kommt (Kim *et al.* 2007). Die Vesikel des Präfusionskomplexes lösen sich anschließend auf und es werden elektronendichte Plaques (500 nm Länge und 10 nm Dicke) entlang der gegenüberliegenden Membranen beobachtet (Abb. 6; Doberstein *et al.* 1997). Es sind höchst transiente Strukturen, da sie sehr selten im Wildtyp, dafür aber



in bestimmten Fusionsmutanten häufiger zu beobachten sind. Interessanterweise beginnt die erste Membranauflösung in der Nähe dieser Plaques und diese sind somit wahrscheinlich eine Voraussetzung für die Vesikulierung (Abb. 6). Die Auflösung der Membran erfolgt entlang der Kontaktzone und erst die ultrastrukturelle Analyse von Fusionsmutanten konnte die Rolle einiger Proteine in der Fusion aufzeigen. So akkumulieren in *singles bar* (*sing*)-Mutanten die Präfusionskomplexe, da diese wahrscheinlich nicht aufgelöst werden können (Estrada *et al.* 2007). In *blow*-Mutanten hingegen werden die Komplexe gebildet und aufgelöst, es kann aber die Membranvesikulierung nicht beobachtet werden (Doberstein *et al.* 1997). Hypomorphe *sns*<sup>15</sup>-Mutanten und amorphe *kette*-Mutanten akkumulieren elektronendichte Plaques, welche im Vergleich zum Wildtyp länger und dünner scheinen (Abb. 4; Paululat *et al.* 1995; Doberstein *et al.* 1997; Schröter *et al.* 2004). Embryonen mit Mutationen im Aktin-Regulator *arp3*<sup>schwächling</sup> zeigen zwar eine cytoplasmatische Kontinuität der miteinander fusionierenden Zellen, aber der Bereich ist deutlich verengt und die FCM kann somit nicht in den wachsenden Muskel integriert werden (Berger *et al.* 2008). Während des ersten Fusionschrittes konnten diese Charakteristika bis auf die Vesikulierung der Membran bisher nicht beobachtet werden (Schröter *et al.* 2006). Auch bei der Betrachtung von *mbc*-Mutanten zeigten sich keine Vesikel oder elektronendichte Plaques (Doberstein *et al.* 1997; Schröter *et al.* 2006).

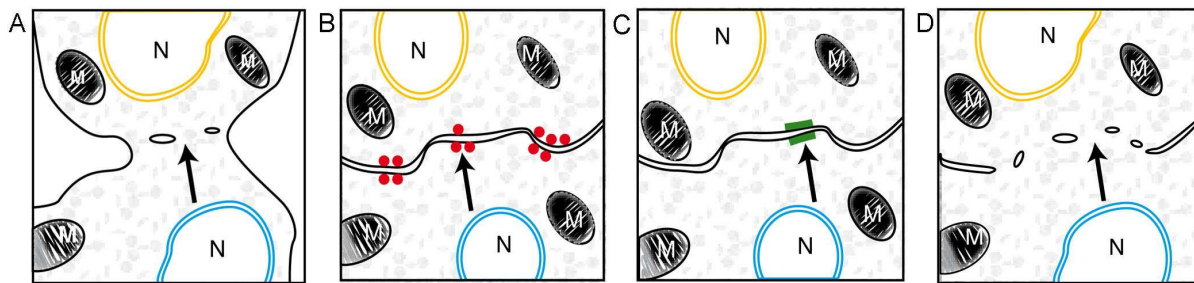


Abbildung 6: **Schematische Darstellung der ultrastrukturellen Eigenschaften während des zweiten Schrittes der Myoblastenfusion.** Nach Erkennung und Adhäsion von FC und FCMs entsteht eine Precursor-Zelle (A). Für den ersten Schritt der Fusion sind bis auf die Vesikulierung der Membran bisher keine ultrastrukturellen Eigenschaften beschrieben. Während des zweiten Schrittes bilden sich elektronendichte Vesikel (rote Punkte in B) und anschließend elektronendichte Plaques (grüne Balken in C). Es folgt die Vesikulierung der Membran und die Expansion der Fusionspore (D). (entnommen aus Oenel *et al.* 2010).

## 2.6 Ribokinasen

Ribokinasen (EC 2.7.1.15) katalysieren die Phosphorylierung von Ribose zu Ribose-5-Phosphat mit Adenosintri-phosphat (ATP) als Donormolekül. Die so aktivierte Ribose wird als erster Schritt des Ribose-Metabolismus in der Zelle gehalten, um schließlich Anwendung in der Energieproduktion im Pentose-Phosphat-Signalweg oder als Kohlenstoffquelle als Bestandteil von Nukleotiden, Histidinen und Tryptophan zu finden. Ribokinasen (RKs) gehören neben der ebenfalls gut analysierten Adenosinkinase (AK) zur Phosphofruktokinase B (PfkB)-Familie der Kohlenhydrat-Kinasen, welche die

Hydroxymethylgruppen von Zuckern phosphorylieren. Die PfkB-Familie (auch RK-Familie) ist einer von drei nicht-homologen Zweigen der Zuckerkinasen neben der Hexokinase- und Galaktokinase-Familie (Bork *et al.* 1993; Park & Gupta 2008). Die Mitglieder der RK-Familie besitzen zwei hochkonservierte Sequenzmotive: N-terminal eine Glycin-reiche Region mit zwei aufeinanderfolgenden Glycin-Resten und C-terminal eine ATP-Bindedomäne mit einer Region, welche ein 'Anionen-Loch' bildet (Sigrell *et al.* 1999). Bei Sequenzvergleichen zwischen Ribokinasen von Pro- und Eukaryoten konnte nur eine Übereinstimmung von ca. 30 % gefunden werden, allerdings ist ihre Kristallstruktur sehr ähnlich (Sigrell *et al.* 1999). Die Ribokinase existiert als Homodimer und jedes Monomer besitzt zwei wichtige Domänen. Die N-terminale Domäne wird gebildet durch ein  $\beta$ -Faltblatt, flankiert von 10  $\alpha$ -Helizes. Dieses ' $\alpha\beta\alpha$ -Sandwich' liefert die spezifischen Bindungsinteraktionen der Substrate Ribose und ATP. Die kleinere Domäne besteht aus 4  $\beta$ -Strängen, welche als 'Lid' (Deckel) über dem Aktiven Zentrum liegen. Die Außenseite des Lids liefert eine Schnittstelle für die Dimerinteraktion, welche für die Aktivität notwendig ist (Abb. 7 und Abb. 8; Sigrell *et al.* 1997, 1998).

Die Bindung des Substrats Ribose führt zu einer drastischen Konformationsänderung und obwohl sich die interne Konfigurationen der  $\alpha\beta\alpha$ -Domäne und der Lid-Domäne nicht ändern, so ändert sich doch ihre räumliche Anordnung zueinander (Abb. 7 und Abb. 8; Sigrell *et al.* 1999, 1998). Dies bezeichnet man auch als Öffnen und Schließen der Lid-Domäne (Sigrell *et al.* 1999). In der geöffneten Form wird Ribose aufgenommen und bindet an der aktiven Stelle in dem  $\alpha\beta\alpha$ -Sandwich. Dies führt zu einem Schließen des Lids, was in einer erhöhten Affinität von ATP zum Enzym resultiert. Das Asparagin in Position 255 in der RK von *E.coli* funktioniert als katalytische Base, welches ein Proton von der 5'-Hydroxylgruppe der Ribose abspaltet. Dieses negativ geladene Teilchen führt zu einem nukleophilen Angriff auf das  $\gamma$ -Phosphat des ATP, was zu einem Transitionsstadium führt. Das Anionenloch stabilisiert dieses Stadium, in dem das  $\gamma$ -Phosphat positioniert ist. Anschließende Bewegungen der Lid-Domäne zeichnet sich wahrscheinlich für den Zusammenbruch des Transitionsstadiums verantwortlich, worauf sich der Dimer wieder öffnet und die Produkte R-5-P und Adenosindiphosphat (ADP) freigelassen werden (Sigrell *et al.* 1999, 1998).

Alle bekannten Kohlenhydrat-Kinasen benötigen divalente Kationen wie Magnesium und Kalzium als elektrophile Katalysatoren des Phosphatgruppentransfers (Andersson & Mowbray 2002). Divalente Kationen neutralisieren die negativen Ladungen auf den Phosphatgruppen der Nukleotide und das eigentliche Substrat dieser Enzyme ist ein Chelat aus Kalzium und ATP (Andersson & Mowbray 2002). Die Ribokinase im Speziellen kann neben Magnesium mit einer etwas geringfügigeren Affinität weitere Metallionen wie  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  und  $Cu^{2+}$  verwenden. Ohne divalente Metallionen ist keine RK-Aktivität nachweisbar (Agranoff & Brady 1956; Schimmel *et al.* 1974; Chuvikovsky *et al.* 2006). Auch monovalente Kationen wie Kalium ( $K^+$ ) und Cäsium ( $Cs^+$ ) sind als Aktivatoren der RK möglich (Abb. 8; Suelter 1970; DiCera 2006). Durch monovalente Kationen verändert sich die Konformation der RK in eine aktivierte Form (Abb. 8; DiCera 2006). Die Struktur der RK von *E.coli* in der Anwesenheit von Cäsium zeigt, dass das Ion zwischen den beiden Loops nahe des 'Anionen-Lochs' des Aktiven Zentrums (Aminosäuren 249 - 251 und 285 - 294 in *E.coli*) bindet. Vermutlich unterstützt diese Bindung die Bildung des 'Anionen-Loches' (Abb. 8; Andersson & Mowbray 2002).

Die Ribokinase zeigt eine hohe Spezifität in den phosphatakzeptierenden Substraten. So ist die Phosphorylierung von D-Ribose und 2-Desoxyribose sehr stark, während andere Zucker nicht als Substrat dienen (Agranoff & Brady 1956; Schimmel *et al.* 1974; Chuvikovsky *et al.* 2006). Die Untersuchung der Spezifität auf Phosphorylgruppen-Donoren ergaben interessante Ergebnisse. Versuche mit CTP in Kalbsleber-RK zeigten, dass eine vergleichbare Enzymaktivität wie mit ATP erreicht werden kann (Agranoff & Brady 1956). In der *E.coli*-RK ist die Aktivität mit GTP nur leicht geringer als mit ATP (Chuvikovsky *et al.* 2006). UTP, TTP, XTP, Phosphoenolpyruvat und Azetylphosphat dagegen stellen keine Phosphatdonoren dar (Schimmel *et al.* 1974).

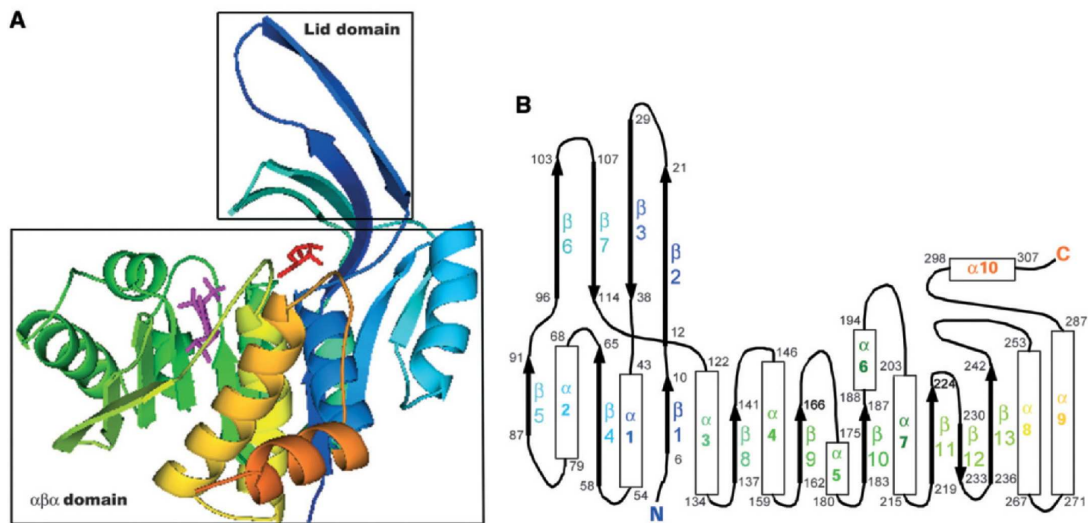


Abbildung 7: **Die Struktur eines *E. coli* Ribokinase-Monomers.** (A) Das Bänder-Diagramm zeigt die geschlossene Form des Enzyms, gebunden mit den Substraten Ribose (Rot) und ADP (violett). Die αβα-Domäne und die Lid-Domäne sind in Kästen aufgeführt und markiert. (B) Das topologische Diagramm zeigt die Organisation und Längen der α-Helices und β-Stränge. Die Helices und Stränge sind in den korrespondierenden Farben zu (A) dargestellt. Die Nummern indizieren die Start- und End-Aminosäureposition jeder Sekundärstruktur (entnommen aus Park & Gupta 2008).

Die katalytischen Aktivitäten sind weiter abhängig von pentavalenten Ionen (PVI) wie Phosphat. Bei Zugabe von anorganischen Phosphat steigt die Enzymaktivität auf das Maximum an (Hao & Gupta 1996; Maj & Gupta 2001). Andere PVIs wie Arsenat und Vanadat führten ebenfalls zu einer Aktivitätssteigerung (Maj *et al.* 2002, 2000). Effekte anderer phosphorylierter Komponenten auf die Enzymaktivität wurden in verschiedenen Studien untersucht (Park *et al.* 2007, 2004, 2006). Zum Beispiel führte die Zugabe von exogenen Acetylphosphat und Phosphoenolpyruvat zu einer maximierten Enzymaktivität. Es sind überwiegend zelluläre Metabolite und zeigen eine physiologisch relevante Rolle als Regulatoren von Phosphat-abhängigen Enzymen. Faktoren wie Phosphonoazet-Säure und Etidronat dagegen inhibieren Ribokinasen und agieren in kompetitiver Weise mit dem aktivierenden Phosphat, was auf dieselbe Bindestelle in der Ribokinase hinweist (Park *et al.* 2007, 2004, 2006). Die konservierten Aminosäuren Asn187 und Glu190 im sogenannten NXXE-Motif der *E.coli*-RK führen

zu einem engen Kontakt mit dem Phosphat im Aktiven Zentrum (Sigrell *et al.* 1998; Maj *et al.* 2002). Die Erzeugung sowohl konstitutiv-aktiver als auch dominant-negativer Mutanten der aus der gleichen Familie stammenden Adenosinkinase heben die Wichtigkeit des NXXE-Motifs für die Phosphataktivierung hervor (Maj *et al.* 2002). Ebenso wurde die Notwendigkeit von katalytischem  $Mg^{2+}$  am Aktiven Zentrum untersucht (Mathews *et al.* 1998). Freies  $Mg^{2+}$  ist für die Aktivität des Enzyms ebenso wichtig wie das Phosphat, obwohl die genaue Rolle des  $Mg^{2+}$ -Ions noch nicht geklärt ist (Maj *et al.* 2002). Möglicherweise hilft es bei der Bildung des Transitionsstadiums durch Steigerung der Elektrophilität des  $\gamma$ -Phosphatatoms des Nukleotids (Parducci *et al.* 2006; Matte *et al.* 1998).

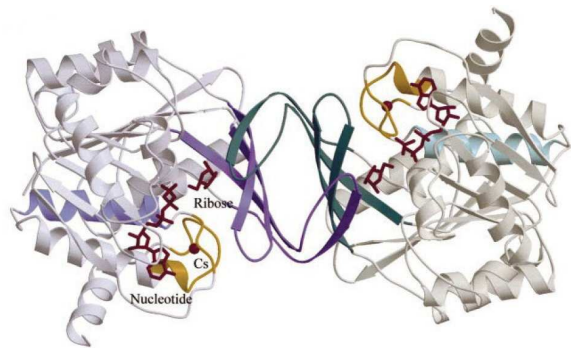


Abbildung 8: **Der Ribokinase-Dimer aus *E. coli* zeigt verschiedene Charakteristika.** Die Ribokinase ist dargestellt als Bänder-Diagramm. Die eine Untereinheit ist violett unterlegt und die andere blau-grün mit der  $\alpha/\beta$ -Domäne etwas heller als die dazugehörigen  $\beta$ -Sheet-Lids. Das Anionen-Loch des Aktiven Zentrums liegt in der Nähe des N-Terminus von Helix  $\alpha 8$ , welche leicht dunkler dargestellt ist als der Rest der  $\alpha/\beta$ -Domäne. Ribose und AMP-PCP (in Stabdarstellung in rot in beiden Untereinheiten. Die erste 249 - 251 und 285 - 294, die beiden Loops der monovalenten Kationen-Bindestellen sind in Gold dargestellt während die Ionen indiziert sind durch rote Kugeln (entnommen aus Andersson & Mowbray 2002)

Vor der Metabolisierung der Ribose muss deren Phosphorylierung durch die Ribokinase erfolgen. Das aktivierte Ribose-5-Phosphat (R-5-P) wird für die Synthese von Nukleotiden und anderen Kofaktoren oder für die Energieproduktion verwendet. In der Vergangenheit betonte die Forschung positive Effekte zusätzlicher Ribose auf das Kardiovaskularsystem (St.Cyr *et al.* 1989). So generiert die PRPP-Synthetase aus R-5-P das Molekül Phosphoribosyl-5-Pyrophosphat (PRPP), welches im Herz-Metabolismus benötigt wird.

Von besonderem Interesse für die mögliche Rolle von Ribokinasen in der Myogenese sind Befunde aus Maus-C2C12-Myoblasten in Kultur. Hier vermitteln Purine wie ATP als Proliferationsregulatoren in den sich entwickelnden Muskeln Entwicklungsstimuli durch Bindung an spezifische Rezeptoren (P2X und P2Y). Diese Analyse erfolgte in C2C12-Myoblasten (Banachewicz *et al.* 2005). Die Aktivierung der P2X und P2Y-Purinrezeptoren ist notwendig für die Aktivität von Kinasen der MAPK/ERK-Klasse (ERK - extracellular signal-regulated kinases; MAPK - mitogen-activated protein kinase) (Banachewicz *et al.* 2005). Diese Aktivierung ist  $Ca^{2+}$ -abhängig und zeigt so die Notwendigkeit von  $Ca^{2+}$  als Signalmolekül zwischen Rezeptoren und dem regulatorischen System der Kinase. Während

der Differenzierung von Myoblasten in Myotuben verändert sich die Expression der P2-Rezeptoren, was auf eine Funktion in der Kontrolle von Zelldifferenzierungen hinweisen könnte (Banachewicz *et al.* 2005). Zusätzlich spielt die Herstellung von extrazellulärem ATP (exATP) als Ligand eine wichtige Rolle in der Regulation der Muskel-Differenzierung und -Kontraktibilität (exATP), speziell untersucht in Vorgängen der C2C12-Myogenese (Choo *et al.* 2008). Dies zeigt sich im Zusammenhang mit der Analyse der Aktivität der Adenylat-Kinase, wobei hier dieses Enzym nur von Myotuben sekretiert wird aber nicht schon zu einem früheren Zeitpunkt von Myoblasten (Choo *et al.* 2008). Die Adenylat-Kinase-Sekretion ist hier für die exATP-Herstellung in Myotuben notwendig, während ein membrangebundenes Enzym kein exATP herstellen kann (Choo *et al.* 2008).

## 2.7 Kalzium als Signalmolekül in der Myogenese

Kalzium reguliert als Signalmolekül viele physiologische Aktionen wie die Zellaktivierung, Differenzierung und Gentranskription in sehr vielen unterschiedlichen Zelltypen wie Lymphozyten, Mastzellen sowie in Muskelzellen (Lewis & Calahan 1989; Feske 2007; Ebashi *et al.* 1969; Baba & Kurosaki 2009). Für die Regulierung der unterschiedlichen Prozesse ist eine Veränderung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen-Konzentration notwendig, verursacht durch die Stimulation von Oberflächenrezeptoren. Dadurch erhöht sich in der Regel die zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration durch Zustrom von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) oder aus dem extrazellulären Raum (Berridge *et al.* 2000). So ist z. B. in Immunzellen, aber auch in anderen Zelltypen die Stimulation von Oberflächenrezeptoren gekoppelt an trimere G-Proteine oder Protein-Tyrosinkinasen, welche Phospholipase C dazu veranlassen Phosphatidylinositol-Bisphosphat zu hydrolysieren, wobei der sekundäre Botenstoff Inositol-1,4,5-trisphosphat (Ins(1,4,5)P3 oder IP3) freigesetzt wird (Abb. 9).

Durch die Bindung von IP3 an dessen Rezeptor am ER erfolgt eine Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus den ER- $\text{Ca}^{2+}$ -Lagern. Die daraus resultierende Konzentrationsverringering des ER-luminalen  $\text{Ca}^{2+}$  führt zu einer Aktivierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen in der Plasmamembran (PM), was wiederum in einem Zustrom von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  über die PM resultiert (Baba & Kurosaki 2009). Dieser Mechanismus wird auch als 'Store-operated-Calcium' (SOC)-Entry bezeichnet (Abb. 9). Eine andere Bezeichnung dieses Vorganges ist der Capacitative Calcium Entry (CCE). Es gibt weitere Mechanismen, wie Zellen mit den Veränderungen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration umgehen (Putney 1990; Parekh & Penner 1997; Parekh & Putney 2005; Putney 2005). Über solche Mechanismen ist das Signal der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Lager an die kapazitativen  $\text{Ca}^{2+}$ -Eingangskanäle in der Plasmamembran verknüpft. Lange Zeit war nicht bekannt, wie die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von der Zelle gemessen und weitere Vorgänge durchgeführt werden können. Der schließlich identifizierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensor ist das 'Stromal interaction molecule' (STIM; Abb. 9).

Während es in Säugern mit STIM1 und STIM2 zwei STIM-Proteine gibt, existiert in *Drosophila* mit D-Stim ein Homolog. Stim-Proteine gelten als Verbindung zwischen dem ER und der Plasmamembran, indem sie die Verringerung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im ER messen, dadurch eine Oligomerisierung der STIM-Proteine zwischem ER und PM stattfindet und diese so näher zueinander herankommen. Dadurch öffnen sich sogenannte CRAC ( $\text{Ca}^{2+}$ -release-activated  $\text{Ca}^{2+}$ -Current)- oder

TRP (transient receptor potential)-Kanäle, um  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in die Zelle zu transportieren (Hoth & Penner 1992; Lewis & Calahan 1989; Zweifach & Lewis 1993; Calahan 2009).

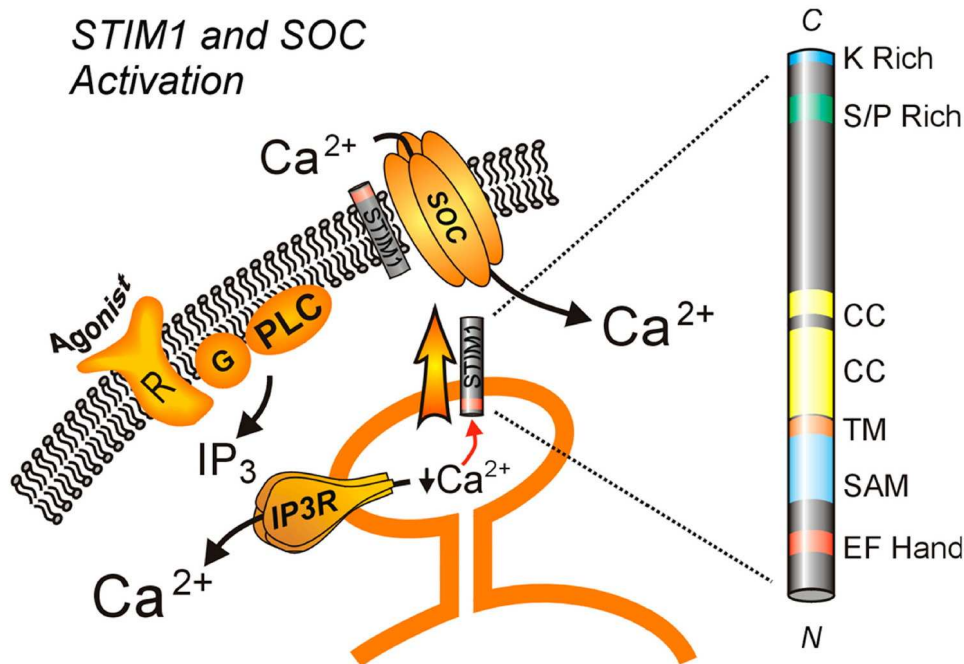


Abbildung 9: **STIM1 und die SOC-Aktivierung.** Die Zellaktivierung beginnt mit der Bindung eines Agens auf dem Oberflächenrezeptor (R) der Membran, durch einen G-Protein-Mechanismus (G) gekoppelt an die Phospholipase C (PLC). Die PLC-Aktivierung führt zu der Bildung von IP<sub>3</sub> (Inositol-1,4,5-triphosphat), welches wiederum dessen Rezeptor (IP<sub>3</sub>R) aktiviert, worauf  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Endoplasmatischen Reticulum (ER) freigelassen wird. Der Abfall der ER- $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wird signalisiert an die SOCs (store-operated channels) in der Plasmamembran durch einen STIM1-Mechanismus im ER oder in der Plasmamembran. Die Struktur von STIM1 beinhaltet eine im ER-Lumen oder extrazellulär liegende EF-Hand- und SAM-Domäne am N-Terminus, gefolgt von einer Transmembrandomäne (TM). Die EF-Hand-Domäne misst die ER- $\text{Ca}^{2+}$ -Menge oder reguliert  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen an der Plasmamembran. C-Terminal befinden sich zwei Coiled-coil-domänen (CC) und jeweils eine Serin/Prolin-reiche (S/P rich) und Lysin-reiche (K rich) Domäne (entnommen aus Putney 2005).

In Abb. 9 wird die Domänenstruktur von STIM-Proteinen hervorgehoben. Sie sind über ihre Transmembrandomäne in der Membran des ER und in der PM verankert und besitzen neben weiteren Domänen eine im Lumen des ER lokalisierte EF-Hand Domäne. Diese Domäne, zuerst als Calmodulin-Fold bezeichnet, wurde zuerst in dem Kalzium-Bindeprotein Parvalbumin beschrieben (Moews & Kretsinger 1975). Proteine mit EF-Hand Domänen sind meist gewebespezifisch exprimiert und klassische Vertreter dieser Klasse sind Calmodulin, Troponin-C, Parvalbumin und Calbindin. Die Domäne besteht aus einem Loop von 12 Aminosäuren, flankiert von zwei  $\alpha$ -Helices. Fünf dieser 12 Aminosäuren besitzen eine Carboxyl- oder Hydroxylgruppe in der Seitenkette, was zu einer präzisen Struktur und somit zu einer genauen Koordination der  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung führt (Heizmann & Hunzi-



ger 1991). Diese Proteine wirken in der Zelle an unterschiedlichen Orten. Während STIM-Proteine membranständig sind, führt z. B. Calmodulin seine Funktion als cytosolisches  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindeprotein aus. In beiden Proteinklassen sind aber die EF-Hand-Domänen die  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensoren, da Stim-Proteine mit Mutationen in dieser Domäne die Fähigkeit zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung verlieren (Ikura 1996; Liou *et al.* 2005; Stathopoulos *et al.* 2006).

Ein weiteres Charakteristikum der STIM-Proteine ist die SAM (sterile alpha motif)-Domäne angrenzend an die EF-Hand Domäne. In Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  existieren die EF-Hand und SAM-Domäne als Monomer. Verringert sich die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führt dies zur Dimer-Bildung. Durch die Auffüllung von  $\text{Ca}^{2+}$  revertieren die Moleküle zu Monomeren, eine durch die SAM-Domäne vermittelte komplett reversible  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Konformationsänderung. Auf der Seite des Zytosols befinden sich zwei Coiled-Coil-Domänen welche neben der Funktion als Interaktionsdomänen die Aufgabe der Translokation von STIM1 und die Aktivierung von SOC-Kanälen übernehmen (Abb. 9; Baba *et al.* 2006; Huang *et al.* 2006).

Die Aufrechterhaltung der ständigen Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen-Konzentration kann außerdem zu Apoptose führen (Calahan 2009). Zytotoxische T-Lymphozyten töten ihre Zielzellen durch Freisetzung von Zytokinen aus lytischen Granula. Diese Zytokinproduktion durch T-Helferzellen und die Zielzell-Tötung ist absolut abhängig von einer bestimmten  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen-Konzentration. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -/Calmodulin-abhängige Phosphatase Calcineurin spielt hier eine wichtige Rolle in der Zytokinproduktion und ist zugleich involviert in die lytische Granula-Exocytose (Pores-Fernando & Zweifach 2009).

Die Verwendung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in Muskelzellen und die Funktion in diesen ist im Kern ähnlich zu den oben beschriebenen Vorgängen. In Muskelzellen ist das sarkoplasmatische Retikulum (SR) der Haupt- $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher und Calsequestrin das Haupt- $\text{Ca}^{2+}$ -Bindeprotein (Aaron *et al.* 1984). Calsequestrin-Proteine werden als Polymer-Kabel angeordnet, binden  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und bringen sie in die Nähe von Kalzium-Kanälen in der PM. Da auch Zellen, in denen Calsequestrin inhibiert wurde,  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in das Myoplasma entlassen können, muss es noch zusätzliche bisher nicht bekannte  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindeproteine geben (Royer & Rios 2009).

Muskelkontraktionen und -Relaxierung sind ebenfalls von  $\text{Ca}^{2+}$  gesteuert (Ebashi *et al.* 1969). Nach der Depolarisierung an T-Tubuli des SRs erfolgt eine schnelle Freilassung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen über Kanäle als Beginn der Kontraktion (Franzini-Armstrong & Protasi 1997). Die schnelle Entfernung von zytosolisch freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen nach der Exzitation führt zur anschließenden Relaxierung.  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen (Sarco(endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen - SERCAs) zeichnen sich hier verantwortlich für die Entfernung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Zytosol (MacLennan 1990).

Eine weitere Aufgabe von Kalzium ist die Zellbewegung und dadurch hervorgerufene Veränderung in der Zellstruktur, initiiert durch Bindung von extrazellulären Liganden an Rezeptoren. Dies geht oft einher mit einem transienten Anstieg von zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$  und die Synthese von phosphorylierten Phosphatidylinositolen oder Polyphosphoinositiden (PPIs) (Janmey 1994). Diese beiden potentiellen Signale an das Zytoskeletts sind nicht unbedingt immer unmittelbare Konsequenzen der Rezeptor-Stimulierung, sondern werden oft selbst moduliert durch Signale wie GTPasen, Pro-

teinkinase oder Ionenkanäle (Stossel 1993). In beweglichen Zellen wie Leukozyten sind mechanische Veränderungen wie die Aktin-Polymerisierung und ein Anstieg an intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen nicht voneinander trennbar. Die Konzentrationen von 100 nM  $\text{Ca}^{2+}$  in ruhenden Zellen und der Anstieg in den  $\mu\text{M}$ -Bereich bei der Initiierung der Aktin-Polymerisation zeigen den Zusammenhang deutlich (Marks & Maxfield 1990). Der kumulative Effekt der erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen liegt wahrscheinlich in der flexiblen Anordnung des Aktin-Zytoskeletts, was Abläufe wie die myosinbasierte Kontraktion, osmotische Expansion und Sekretion erlaubt (Meyer & Aebi 1990; Janmey 1994).

## 2.8 Problemstellung: Identifikationen neuer Komponenten in der Myogenese

### 2.8.1 Die Mutante *E832* (P3-106/2) und ihre mögliche Rolle in der Mesodermentwicklung

Die mit EMS erzeugte Mutante *E832* (P3-106/2) hat einen eindeutigen Defekt in der embryonalen Entwicklung der larvalen Muskulatur in *Drosophila melanogaster*. In der somatischen Muskulatur sind Bereiche ohne Muskeln zu beobachten und die übrigen Muskeln sind teilweise verkürzt und dünner und binden nicht mehr an die vorgeschriebenen Stellen in der Epidermis (Reichert 2004). Da nicht viele unfusionierte Myoblasten zu erkennen sind und auch die Anzahl der somatischen FCs reduziert erscheint, wurde ein Defekt in der Determination der Myoblasten angenommen (Wierach 2005). Ebenfalls konnte eine Störung in der Entwicklung der viszeralen Muskulatur beobachtet werden (Wierach 2005). In vorangegangenen Arbeiten konnte bereits eine Lokalisationskartierung vorgenommen und der Bereich der Mutation eingegrenzt werden (Reichert 2004; Wierach 2005). Diese Arbeit setzt sich nun zum Ziel, das betroffene Gen zu identifizieren. Daraufhin soll das Gen auf dessen Funktion als Protein hin in der Myogenese analysiert werden. Dazu werden Rettungsexperimente mit UAS-Konstrukten und Überexpressionsstudien herangezogen. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Herstellung eines Antikörpers, um die Proteinexpression genauer zu studieren. Desweiteren sollen anschließend auch Interaktionspartner des betroffenen Faktors zur Analyse hinzugezogen werden, um eine erste Einbindung des identifizierten Faktors in bereits bestehende Signalkaskaden beschreiben zu können.

### 2.8.2 Kalzium-Bindeproteine in der Myogenese

In Vertebraten ist Kalzium ein wichtiger Faktor während der Muskelkontraktion (Tupling 2009). Die Lyse der Vesikel im Präfusionskomplex von *Drosophila melanogaster* bei der Fusion von Funderzellen und fusionskompetenten Myoblasten ist ein essentieller Schritt, um die Membran zu vesikularisieren (Doberstein *et al.* 1997). Diese Lyse könnte unter Umständen mit Hilfe von Kalzium durchgeführt werden, obwohl dies bisher noch nicht gezeigt wurde. Kalzium wird von Bindeproteinen zu den Orten ihrer Notwendigkeit transportiert, welche durch Domänen des EF-Hand-Typs charakterisiert sind. Proteine mit EF-Hand-Domänen sind eine heterogene Gruppe mit diversen Funktionen und einer recht großen Anzahl im humanen Genom mit ca. 240 kodierten Proteinen (Schwaller 2009). In dieser Arbeit sollen erste Untersuchungen von Kalzium-Bindeproteinen und ihrer möglichen Rolle



während der Myogenese von *Drosophila* durchgeführt werden. Dazu können Domänen-Datenbanken hinzugezogen werden, um die Gesamtheit der Kalzium-Bindeproteine im Proteom zu durchsuchen. Erste Hinweise sind bereits in der Literatur vorhanden. Estrada und Kollegen zeigten ein mesodermal in den FCMS-exprimiertes Gen mit einer Kodierungskapazität für ein Kalzium-bindendes Protein (Estrada *et al.* 2006). Dies wird unterstützt von einem von Furlong und Kollegen durchgeführten 'Screen', in dem dieses Gen als Ziel des Transkriptionsfaktors Twist identifiziert wurde (Furlong *et al.* 2001). Die mögliche Rolle in der Myogenese kann durch die mRNA- oder Protein-Expression nachgewiesen werden. Mit Hilfe dieser Untersuchung kann die Möglichkeit einer Notwendigkeit von Kalzium und Kalzium-Bindeproteinen in der Muskelentwicklung von *Drosophila* beginnend analysiert werden.

## 3 Material

### 3.1 Geräte

Apotom-Mikroskop	Zeiss Axioplan2 Imaging, Jena
Binokulare	Stemi SV6, Zeiss, Jena
Digitalkamera	Powershot C5, Canon
Elektrophorese-Apparaturen	Werkstätten MPI Martinsried und Univ. Marburg
Elektrophorese-Spannungsquellen	Biometra Power Pack P25, München
Fotomikroskop	Axioskop, Zeiss, Jena
Heizblock	HBT 130, Heep Labor Consult, Boven
Kühlzentrifuge	Megafug 1.0 R, Heraeus, Hanau
Magnet-Kochrührer	Variomag Mono, H+P Labortechnik, München
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank	HeraSafe, Heraeus, Hanau
PCR-Maschine	Personal Cyclor, Biometra, Göttingen
pH-Meter	GPRT 1400A, Greisinger Electron
Photometer	Biomate Thermoscientific, Dreieich
Reaktionsgefäßschüttler	Rexa 2000, Heidolph, Schwabach
3D-Schüttler	Rocky®, Föbel Labortechnik, Lindau
Schüttler	WT-12, Biometra, GFL 3005/3033, Burgwedel
Tischzentrifugen	Biofuge, Heraeus, Hanau
UV-Transilluminator	TI1, Biometra, Göttingen
Vortex-Gerät	Reax 200, Heidolph, Schwabach
Wasserbad	GFL 1002, Biometra, Burgwedel

### 3.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien und Nährmedien wurden von den Firmen Fluka (Taufkirchen), Invitrogen/Gibco (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Taufkirchen) bezogen.

### 3.3 Enzyme

Alkalische Phosphatase (CIP - calf intestine alkaline phosphatase)	Roche Diagnostics, Mannheim
Klenow Enzym	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
KOD®-Proof Reading-Polymerase	Merck, Darmstadt
Proteinase K	Roche Diagnostics, Mannheim
RNase A	Roche Diagnostics, Mannheim

Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
AXON-Taq-DNA-Polymerase	Axon Labortechnik, Kaiserslautern
T3 RNA-Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim
T7 RNA-Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim
SP6 RNA-Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim
T4 DNA-Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Roth

### 3.4 Molekularbiologische Reagenzien und Reagenziensätze

DIG RNA Labeling and Detection Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
Fluoromount G	Southern Biotechnology Associates, Birmingham (USA)
GFX PCR, DNA and Gel Purification Kit	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Jetsorb	GENOMED, Bad Oeynhausen
Jetstar Plasmid Kit 2.0	GENOMED, Bad Oeynhausen
Mass Ruler DNA-Ladder Mix	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)	Roche Diagnostics, Mannheim
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
OneStep RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe
TSA™ Fluorescein System	Perkin Elmer Life Sciences, Boston (USA)
Vectastain Elite ABC Standard Kit	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP)	Roche Diagnostics, Mannheim
Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe

### 3.5 Sonstige Materialien

Dan Klorix	Colgate-Palmolive, Hamburg
HybondN-Membran	GE Healthcare, Freiburg
Select Agar	Invitrogen/Gibco, Karlsruhe
Bactotrypton	Becton & Dickinson, Heidelberg
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Steinheim
Ethidiumbromid	Sigma, Steinheim
Ethyldiaminotetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd	Merck, Darmstadt

Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
Lithiumacetat	Sigma, Steinheim
Methyl-1-4-Hydroxybenzat (Nipagin)	Merck, Darmstadt
Nickelchlorid	Roth, Karlsruhe
Octylphenoethylenglycoether (Triton X-100)	Roth, Karlsruhe
Polyethylenglykon 3350 (PEG)	Sigma, Steinheim
Polyethylensorbitanmonolaurat (Tween-20)	Roth, Karlsruhe
3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB)	Sigma, Steinheim

### 3.6 Antikörper und Seren

Die verwendeten Antikörper wurden in immunhistochemischen Färbungen in der angegebenen Verdünnung verwendet. Bei Fluoreszenzfärbungen ist die Verdünnung nur halb so stark zu verwenden.

$\alpha$ - $\beta$ -Galaktosidase	Biotrend, Köln
polyklonal aus Kaninchen; 1:5000 bzw. 1:3000	Cappel, MP Biomedicals, Ohio (USA)
$\alpha$ - $\beta$ 3-Tubulin	Leiss <i>et al.</i> 1988
polyklonal aus Meerschweinchen; 1:15000	
$\alpha$ -Digoxigenin-Fab-Fragment	Roche Diagnostics, Mannheim
polyklonal aus Schaf; 1:1000	
$\alpha$ -Kirre	K.F. Fischbach, Freiburg
polyklonal aus Kaninchen; 1:1000	
$\alpha$ -FasciclinIII	Patel <i>et al.</i> 1987
monoklonal aus Maus; 1:50	
$\alpha$ -Polycystic kidney disease gene 2 (Pkd2)	C. Montell, Baltimore (USA)
polyklonal aus Kaninchen, 1:300	
$\alpha$ -Lame duck (Lmd)	H. Nguyen, Erlangen
polyklonal aus Kaninchen	
$\alpha$ -Myocyte enhancing factor (D-Mef2)	H. Nguyen, Erlangen
polyklonal aus Kaninchen	
$\alpha$ -Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK)	Loren <i>et al.</i> 2003
polyklonal aus Kaninchen, 1:500	
Biotinyliertes $\alpha$ -Kaninchen IgG	Vektor Laboratories, Burlingame (USA)
aus Ziege, 1:500	
Biotinyliertes $\alpha$ -Maus IgG	Vektor Laboratories, Burlingame (USA)
aus Pferd, 1:500	
Cy2 gekoppelte $\alpha$ -Maus IgG	Dianova, Hamburg

1:100	
Cy3 gekoppelte $\alpha$ -Maus IgG	Dianova, Hamburg
1:100	
Cy2 gekoppelte $\alpha$ -Kaninchen IgG	Dianova, Hamburg
1:100	
Cy3 gekoppelte $\alpha$ -Kaninchen IgG	Dianova, Hamburg
1:100	
Ziegen-/Pferdeserum	Vektor Laboratories, Burlingame (USA)

### 3.7 Lösungen und Puffer

#### HS (Hybridization solution)

50 ml Formamid

25 ml 20x SSC

0,1 ml Heparin (50 mg/ml)

0,1 ml Tween20

Wasser ad 100 ml

#### 20x SSC

0,15 mol/l NaCl

15 mmol/l Trinatriumcitrat

#### 10x PBS

1,3 mol/l NaCl

70 mmol/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

30 mmol/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

#### PBT

1x PBS

0,1 % Tween20

#### 10x DIG1

1 mol/l Tris/HCl

1,5 mol/l NaCl pH 7,5

## **DIG2**

1x DIG1

1% Blocking Reagenz (w/v)

zum Lösen 30 min. bei 70 °C erhitzen

## **DIG3**

100 mmol/l Tris/HCl

100 mmol/l NaCl

50 mmol/l MgCl<sub>2</sub> pH 9,5

## **4 % F-PBS**

2 g Para-Formaldehyd

bei 60 °C gelöst in 50 ml 1x PBS

## **TNX**

0,7 % NaCl

0,01 % TritonX-100

## **10x TBE**

0,89 mol/l Tris

0,89 mol/l Borsäure

4 ml/l 0,5 mol/l EDTA

## **Injektionspuffer**

1mM NaHPO<sub>2</sub> (pH 7,4)

50mM KCl

## **S1**

50 mmol/l Tris/HCl pH 8,0

10 mmol/l EDTA

100 µg/ml RNaseA (1 mg/ml Stocklösung)

## **S2**

200 mmol/l NaOH

1 % (w/v) SDS

**S3**

2,6 mol/l Kaliumacetat pH 5,2  
(mit Essigsäure einstellen)

**EPON**

51,5 % Epoxyharz (w/v)  
28 % Epon Härter DDSA (w/v)  
19 % Epon Härter MNA (w/v)  
1,5 % Eponbeschleuniger DMP30 (w/v)

**Hoyer's Medium**

20 g Glycerin  
30 g Gummi-Arabicum  
200 g Chloralhydrat  
50 ml Wasser

**TFB1**

10 mM RbCl<sub>2</sub>  
50 mM MnCl<sub>2</sub>  
30 mM KCl  
10 mM CaCl<sub>2</sub>  
15 % (w/v) Glycerin pH 5,8

**TFB2**

10 mM MOPS (pH 6,8)  
10 mM RbCl<sub>2</sub>  
75 mM CaCl<sub>2</sub>  
15 % (w/v) Glycerin pH 8

**10x DNA-Auftragspuffer**

0,1 % (w/v) Bromphenolblau  
0,1 % (w/v) Xylencyanol  
0,9 % (w/v) Borsäure  
40 % (v/v) Glycerin in TBE

### 3.8 Nähr- und Zuchtmedien

#### Maisgriesagar

60 % Maisgries  
7,15 % Fruktose  
1,2 % Trockenhefe  
0,14 % Nipagin  
0,6 % Propionsäure  
0,7 % Agar

#### Fruchtsaftagar

25 % Fruchtsaft  
1,25 % Saccharose  
2,5 % Trockenhefe  
0,2 % Nipagin  
2,7 % Agar

#### SOC-Medium

0,5 % (w/v) Hefeextrakt  
2,0 % (w/v) Baktotrypton  
10 mM NaCl 2,5 mM KCl  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
20 mM MgSO<sub>2</sub>  
20 mM Glukose

#### LB-Medium (Luria-Bertani) pH 7,0

1 % (w/v) Baktotrypton  
0,5 % (w/v) Hefeextrakt  
0,5 % (w/v) NaCl  
(wahlweise mit Agar für Platten)  
1,5 % (w/v) Baktoagar

### 3.9 Synthetische Oligonukleotide

Die synthetisierten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG (Ebersberg) bezogen. **Artifizuell eingeführte Restriktionsenzym-Schnittstellen sind fett markiert.**



Bezeichnung	Sequenz
17010Bglfwd	CTAGATCTCCCTTTCAAATGGGAAAG
17010rev3kpn	GCCGGGTACCTGCTTTGTTGGCAGGTGG
UASCG17010	CGGAGTACTGTCCTCCGAGC
17010A2fwd	TTTCCCCCAACCAAAATCTCTGTAAAGT
17010B2rev	ATTCATATCCGTTTCCAGTTGGCAGAGA
17010C2fwd	GGGCTAAGAAGTCCTTTCAGGATGCGAA
17010D2rev	GCCGCGGCGGCCCATGGAGTAGGCGGCG
17010E2fwd	GTCCACAGAACATCATATCAGTGCGGCA
17010F2rev	TTTAATATTTTCTATGCGAATAGTTTAA
Bru2Bglfwd	CGAGATCTATGATGTTGCAATCCTTG
Bru2rev3kpn	GCCGGGTACCTAAAAATTGCAAGTCGGA
CG4983bglfwd	ATATAGATCTCCCAACATGTTTCCTGATGAC
CG4983Xhorev	GGTCCTCGAGGGAAAGTACAGCATCGCTGAACCA
Arp1BADfwd	GTGCGAATTCATGGAGCCTTATGATGTCGTCGTC
Arp1BADrev	GTGCCTCGAGAGTCTTTCTGTGCACGGCTTT
pkd2Bglfwd	CGAGATCTATGGCCCAGCAGGGT
pkd2rev3kpn	GCCGGGTACCTTTTTTCTTGTATGGTAATCTTT
31763fwdEco	GTCAGAATTCATGGAATGCGGCAATTCCTTA
31763rev2	GATCCTCGAGATTACCTGGAATAAATATGGCGC
CG31862fwdEco	CTGGGAATTCCTGACAGTAGTCATGACAATCATTGTATTGGCA
CG31862revXho	CTGGCTCGAGAAACAAATCGATGATATGGGCCACATAAGTCCTT

### 3.10 Sequenzierung

Die Sequenzierungen der DNA-Proben wurden von den Firmen SeqLab GmbH (Göttingen) und Ago-wa GmbH (Berlin) durchgeführt.

### 3.11 cDNAs

Die cDNAs sind online bei der 'Drosophila Genome Resource Center' (DGRC)-Homepage käuflich zu erwerben (<https://dgrc.cgb.indiana.edu/>).

Bezeichnung der cDNA	Name des Gens
GH13257	<i>CG17010</i>
LD19052	<i>bruno2</i> ( <i>CG31761</i> )
SD04693	<i>kosh</i> ( <i>CG10641</i> )
RH04757	<i>Arp87C</i> ( <i>Arp1</i> , <i>CG6174</i> )
GH02446	<i>Msp-300</i> ( <i>CG33715</i> )
AT30048	<i>Tsp33B</i> ( <i>CG14936</i> )
GH17939	<i>CG4983</i>
GH18077	<i>CG6614</i>
AT15627	<i>CG12307</i>
RE59904	<i>CG14937</i>
RE70525	<i>CG12602</i>
SD07295	<i>CG4970</i>
LD32687	<i>CG6509</i>
LP04141	<i>CG6488</i>
RH09469	<i>CG13369</i>

### 3.12 Fliegenstämme

#### Mutanten und Defizienzen

<i>E832</i> /CyOhg <i>lacZ</i>	EMS-Mutante auf dem zweiten Chromosom Hummel <i>et al.</i> 1999a,b
rP298 <i>lacZ</i> /+; <i>E832</i> /CyOhg <i>lacZ</i>	EMS-Mutante auf dem zweiten Chromosom gekreuzt mit der 'Enhancertrap'-Linie rP298 <i>lacZ</i> auf dem X-Chromosom
<i>32F-sm</i>	entkoppelte Linie der EMS-Mutante <i>E832</i> (32F2-33A1)
<i>bubbles</i> <sup>33E-m</sup>	entkoppelte Linie der EMS-Mutante <i>E832</i> (33E1-33E3)
<i>33E-vm</i>	entkoppelte Linie der EMS-Mutante <i>E832</i> (33E1-33E3)
Df(2L)32FP01	Defizienz (32F1-2; 33A1-2; A. Carpenter; Cambridge, UK)
Df(2L)ED775 (BL8907)	Defizienz (33B8; 34A3)
Df(2L)BSC237 (BL9712)	Defizienz (33D2; 33F2)
Df(2L)BSC407 (BL24911)	Defizienz (32F2; 33B5)
Df(2L)escP3-0 (BL3131)	Defizienz (33A1; 33E)
CG4983-RNAi	RNAi-Stamm des CG4983 (Insertion 2. Chromosom; Dietzl <i>et al.</i> 2007)

CG31862-RNAi	RNAi-Stamm des CG31862 (Insertion 3. Chromosom; Dietzl <i>et al.</i> 2007)
Arp1 <sup>1</sup>	Arp1-Mutante Haghnia <i>et al.</i> 2007
Arp1 (BL11424)	Arp1-Mutante (P{Bac}Arp1)
Df(3R)ED5591/TdlZ (BL9086)	Arp1-Defizienz (87B7; 87C7)
Pkd2 <sup>1</sup>	Pkd2-Mutante Watnick <i>et al.</i> 2003
<u>Gal4-Treiberlinien:</u>	
rP298-Gal4	Gal4-Linie im Duf/Kirre-Muster Menon & Chia 2001
D-Mef2-Gal4	Gal4-Linie im D-Mef-Muster Ranganayakulu <i>et al.</i> 1995
24B-Gal4	Gal4-Linie für das gesamte Mesoderm Brand & Perrimon 1993
SNS-Gal4	Gal4-Linie im SNS-Muster (M. Leptin, Köln)
Wg-Gal4 (BL4918)	Gal4-Linie im Wingless-Muster
<u>Balancer:</u>	
rP298 <i>lacZ</i> /+; If/CyOh <i>glacZ</i>	Blau-Balancerstamm mit Markern für das zweite Chromosom und dem Enhancertrap rP298 <i>lacZ</i> auf dem X-Chromosom (zur Verfügung gestellt von A. Holz, Giessen)
If/CyOh <i>glacZ</i>	Blau-Balancerstamm mit Markern für das zweite Chromosom (M. Affolter, Basel)
Dr/TdlZ	Blau-Balancerstamm mit Markern für das dritte Chromosom (zur Verfügung gestellt von A. Holz, Giessen)
Sp/CyOh <i>glacZ</i> ; TM2/TdlZ	Blau-Balancerstamm mit Markern für das zweite und dritte Chromosom (zur Verfügung gestellt von S. Önel, Marburg)

## 4 Methoden

### 4.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden

#### 4.1.1 Herstellung chemisch kompetenter *Escherichia coli*-Zellen

Nachdem 250 ml LB-Medium mit 2,5 ml einer frischen *Escherichia coli*-Kultur angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 - 0,6 schüttelnd inkubiert wurden, lagert man die Zellen für 15 min. auf Eis bis sie bei 4000 UpM bei 4°C für 10 min. abzentrifugiert werden. Der Überstand wird verworfen und die Zellen in 200 ml eiskalten TFB1 resuspendiert und wieder für 15 min. auf Eis gelagert. Nach der folgenden Zentrifugation bei 4000 UpM bei 4 °C für 10 min. wird der Überstand verworfen und die Zellen in 20 ml TFB2 resuspendiert. Abschließend erfolgt eine weitere Inkubation für 15 min. auf Eis, bevor die kompetenten Zellen aliquotiert und in flüssigen Stickstoff schockgefroren werden. Die Lagerung erfolgt bis zur Verwendung der Zellen bei -80 °C.

#### 4.1.2 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente *Escherichia coli*-Zellen

Zur Vermehrung von Plasmid-DNA können kompetente *E. coli*-Zellen durch Integration eines Plasmids transformiert werden. Dazu gibt man ca. 10 ng Plasmid-DNA auf 50-100 µl chemisch kompetenter Zellen und inkubiert den Ansatz 30 min. auf Eis. Dann erfolgt bei 42 °C für 90 sec. ein Hitzeschock. Der Ansatz wird 5 min. auf Eis gestellt, bevor 250-500 µl LB- oder SOC-Medium dazugegeben und dieses schüttelnd bei 37°C für 30 bis 60 min. inkubiert wird. Anschließend werden 100 µl der Reaktion auf LB-Platten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert (je nach Resistenzmarkers des Plasmids). Die Inkubation der Platten erfolgt üN bei 37 °C (Sambrook *et al.* 1989).

#### 4.1.3 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

**DNA-Präparation im analytischen Maßstab** Von einer 3 ml *E. coli*-Kultur werden 1,5 ml in einem Reaktionsgefäß bei 13000 rpm für 1 min. zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und 250 µl der S1-Lösung hinzugefügt. Nach Resuspension gibt man 250 µl S2-Lösung hinzu. Dieses wird nun invertiert und anschließend 5 min. bei RT inkubiert. Dann gibt man 250 µl S3-Lösung hinzu, invertiert dieses ebenfalls und inkubiert 10 min. auf Eis. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation bei 13000 rpm für 10 min.. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und 0,8 V Isopropanol hinzugefügt und gemischt. Anschließend wird 30 min. bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nun gibt man 100 µl 70 % Ethanol hinzu und zentrifugiert dieses 10 min. bei 13000 rpm. Der Überstand wird verworfen und das Pellet getrocknet. Schließlich gibt man destilliertes Wasser hinzu. Das Volumen kann frei gewählt werden, je nach Konzentration der DNA und schüttelt diesen Ansatz bis sich die DNA nach ca. 30 min. gelöst hat (Birnboim & Doly 1979).

**DNA-Präparation im quantitativen Maßstab (Jetstar Genomed)** Von einer 50 ml *E. coli*-Kultur wird der gesamte Ansatz in einem 50 ml-Reaktionsgefäß bei 4500 rpm für 10 min. zen-

trifugiert. Nach Verwerfung des Überstandes, werden 4 ml E1-Lösung hinzugefügt und das Pellet resuspendiert. Dann gibt man 4 ml E2-Lösung hinzu und invertiert vorsichtig. Der Ansatz wird 5 min. bei RT inkubiert, bevor 4 ml E3-Lösung hinzugegeben werden. Nach Invertieren wird der Ansatz bei 4°C und 6000 rpm 10 min. zentrifugiert. Während dessen wird die Säule äquilibriert, indem 10 ml E4-Lösung auf diese gegeben wird. Nachdem die E4-Lösung durch die Säule gelaufen ist, wird der zentrifugierte Überstand ohne weißes Präzipitat auf die Säule gegeben. Anschließend wäscht man zweimal mit jeweils 10 ml E5- Lösung, bevor zur Elution 5 ml E6-Lösung hinzugegeben wird. Zu der eluierten Lösung gibt man 0,7 V Isopropanol und zentrifugiert 30 min. bei 4500 rpm. Der Überstand wird abgenommen und 1 ml 70 % Ethanol zu dem Pellet hinzugefügt. Dieses wird 10 min. bei 4500 Methoden rpm zentrifugiert. Anschließend nimmt man den Alkohol ab, lässt das Pellet kurz an der Luft trocknen und gibt ca. 50 bis 75 µl destilliertes Wasser hinzu und schüttelt das Gefäß bis zu 30 min, bis das Pellet sich gelöst hat. Das Volumen richtet sich danach, wie stark die DNA-Lösung konzentriert sein soll. An diese Präparation schließt sich eine Bestimmung der DNA-Konzentration an (siehe dazu: Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration).

#### 4.1.4 Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration

**Bestimmung mittels Photometrie** Nukleinsäuren haben bei der Wellenlänge von 260 nm ihre maximale Absorption. In diesem Bereich ist eine Konzentrationsmessung möglich. Die DNA-Lösung wird verdünnt und die Absorption gegen Wasser als Referenz bei der Wellenlänge von 260 nm im Photometer gemessen. Um die Konzentration zu erhalten, wird folgende Formel angewendet:  $OD_{260nm} * Verdünnung * 0,05 = \text{Konzentration } [\mu\text{g}/\mu\text{l}]$ .

**Bestimmung mittels Agarosegelelektrophorese** Diese Methode kann angewendet werden, um geringe Mengen an Nukleinsäuren zu quantifizieren, deren Konzentration unter dem Messungsbereiches des des Photometers liegt. Die Nachweisgrenze liegt hier bei 5 ng pro Bande. Dazu trägt man 1 µl Probe mit 1 µl 5x Auftragspuffer neben 4 µl MassRuler DNA-Ladder (MBI, Fermentas) auf einem 1 %igen Agarosegel auf. Die Konzentration kann anschließend anhand der Länge des Fragmentes und der aufgetragenen Menge des DNA-Markers bestimmt werden

#### 4.1.5 DNA-Präzipitation mit Ethanol

Hier werden 2,5 V 98 % eiskaltes Ethanol und 1/10 V 3 mol/l Natriumacetat zu der DNA-haltigen Lösung gegeben und 20 min. auf Eis inkubiert. Anschließend zentrifugiert man 30 min. bei maximaler Geschwindigkeit. Der Überstand wird verworfen, 100 µl 70 % Ethanol hinzugefügt und 20 min. bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Danach verwirft man den Überstand, lässt den restlichen Alkohol verdunsten und gibt je nach gewünschter DNA-Konzentration 10-50 µl destilliertes Wasser hinzu (Ausubel *et al.* 1993; Crouse & Amorese 1987).

#### 4.1.6 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Mit Hilfe der Gelelektrophorese kann man DNA-Fragmente in einer Größenklasse von 100 bp bis zu 10 kb auftrennen. Die Agarose hatte eine Konzentration von 0,8 bis 1,5 %, gelöst in TBE-Puffer. Höherprozentige Gele zeigen eine bessere Auftrennung von kleineren Fragmenten bis zu 500 bp. Der Agarose wird zusätzlich Ethidiumbromid (0,5 µl/µg) zugesetzt, welche als interkalierende Chemikalien unter UV-Licht die DNA-Banden visualisiert. Als Laufpuffer ist ebenfalls TBE zu verwenden. Bevor die Proben in die Taschen der Agarose gefüllt werden, werden noch 1/10 V 10x Auftragspuffer hinzugefügt. Nach dem Auftragen erfolgt die Auftrennung in einem Spannungsfeld von 60-100 V.

#### 4.1.7 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Bevor eine Methode zur Elution gewählt wird, muss das zu eluierende DNA-Fragment auf einem Agarosegel aufgetrennt werden, so dass eventuelle Nebenbanden zu unterscheiden sind. Das DNA-Fragment wird unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und in einem Reaktionsgefäß gewogen.

**Jetsorb-Methode (Jetsorb Genomed)** Pro 100 mg Gel werden 300 µl Lösung A und 10 µl Jetsorb-Suspension hinzugefügt und dieser Ansatz bei 50 bis 60 °C 15 min. inkubiert. Während dieser Zeit sollte das Reaktionsgefäß mehrmals kurz geschüttelt werden. Nach 15 min. wird der Ansatz 1 min. bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen, ohne das Pellet zu zerstören. Danach wird 300 µl Lösung A zugegeben und gevortext. Anschließend wird wieder 1 min. bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Jetzt werden 300 µl Lösung B hinzugefügt, gevortext, bei 13000 rpm 1 min. zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Dieser Schritt wird wiederholt. Anschließend trocknet das Pellet an der Luft. Dann werden 20 µl destilliertes Wasser hinzugefügt, gevortext und dieser Ansatz bei 50 °C 5 min. inkubiert. Anschließend wird zentrifugiert und der Überstand mit der darin gelösten DNA in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

**GFX-Methode (GE Healthcare)** Pro 10 mg Gel werden 10 µl 'Capture Buffer' hinzugefügt und 5-15 min. bei 50-60°C inkubiert. Wenn sich die Agarose gelöst hat, wird der Ansatz auf eine Säule gegeben und 1 min. inkubiert. Anschließend zentrifugiert man die Säule bei 13000 rpm 1 min. lang und verwirft den Überstand. Auf die Säule werden 500 µl Waschpuffer gegeben und zentrifugiert (13000 rpm). Danach wird der Überstand verworfen, destilliertes Wasser auf die Säule gegeben und dieser Ansatz 1 min. inkubiert. Das Volumen richtet sich danach, wie stark die DNA-Lösung konzentriert sein soll. Anschließend wird bei 13000 rpm zentrifugiert, nachdem unter die Säule ein neues Reaktionsgefäß gestellt wurde.

#### 4.1.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (Polymerase chain reaction - PCR) können DNA-Abschnitte amplifiziert werden, wobei nur die flankierenden Bereiche bekannt sein müssen. An diese Bereiche

binden spezifische Oligonukleotide (Primer). Unter Anwendung der Taq-Polymerase (thermostabil, aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*) ist nach Annealing der Primer eine Elongation durch die Polymerase möglich. So kann das DNA-Fragment exponentiell vermehrt werden. Sind an dem Primer artifizielle Schnittstellen angefügt, bietet sich die Zwei-Schritt-PCR an, wobei im ersten Schritt die Annealing-Temperatur niedriger zu wählen ist als im zweiten, so dass eine Amplifikation stattfindet, obwohl in den ersten Zyklen die Primer nicht komplett komplementär zur Matrize sind. Die jeweiligen Reaktionsansätze richten sich nach den Angaben der Hersteller der verwendeten Polymerase. Zur Analyse werden 10µl des PCR-Ansatzes auf ein Agarosegel aufgetragen (Saiki *et al.* 1988).

### Programm der PCR-Reaktion (Zwei-Schritt-PCR)

Schritt	Prozess	Temperatur	Dauer
1	Initial-Denaturierung	95°C	5 min.
2	Denaturierung	95°C	30 sec.
3	Primer-Annealing	Primer-Schmelztemperatur -5°C	30 sec.
4	Elongation	72°C bzw. 68°C	ca. 1 kb pro 1 min.
5	Schritt 2-4 wiederholen (3x)		
6	Denaturierung	95°C	30 sec.
7	Primer-Annealing	Primer-Schmelztemperatur	30 sec.
8	Elongation	72°C bzw. 68°C	ca. 1 kb pro 1 min.
	Schritt 6 bis 8 wiederholen (30x)		
9	Schluss-Elongation	72°C	5 min.
10	Pause	4°C	-

#### 4.1.9 Klonierung von PCR-Produkten in den TOPO-Vektoren

Zur Zwischenklonierung der mittels PCR amplifizierten Fragmente wird der pCR®-TOPO-TA-Vektor verwendet, wenn mit der Taq-Polymerase überstehende Enden produziert werden. Bei einer Proofreading-Polymerase wie der KOD®-Polymerase entstehen keine Überhänge, sondern glatte Enden, so dass hier den pCR®-Blunt II-TOPO®-Vektor anzuwenden ist. Dazu werden 0,5 µl Vektor mit 2-5 µl PCR-Produkt (je nach DNA-Konzentration) auf insgesamt 6 µl mit destilliertem Wasser zusammengegeben. Der Ansatz wird 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert und davon anschließend 3 µl auf TOP10-Zellen auf Eis hinzugegeben. Diesen inkubiert man bis zu 30 min. auf Eis. Dann erfolgt bei 42°C ein Hitzeschock für 90 sec. Anschließend wird 250 µl SOC- oder LB-Medium zugegeben und dieses 30 min. bis 1 Stunde bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Dann plattiert man ca. 100 µl auf LB-Platten mit den entsprechenden Antibiotika aus (TOPO-TA – Ampicillin, TOPO-Blunt – Kanamycin). Die Platten werden üN bei 37 °C inkubiert.

#### 4.1.10 Enzymatische Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

DNA-Sequenzen können mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen fragmentiert werden. Die einzusetzende Menge an Restriktionsenzymen wird folgendermaßen berechnet:  $48,5 \text{ kb (bp l)} \cdot \text{Anzahl Schnittstellen in Ziel-DNA} / \text{Größe Ziel-DNA (bp)} \cdot \text{Anzahl Schnittstellen in } \lambda\text{-DNA} = \text{benötigte Enzymmenge (U/}\mu\text{g DNA)}$ . Die Berechnung basiert auf der Einheit Unit für die Restriktionsenzyme. 1 Unit ist die Enzymmenge, welche 1  $\mu\text{l}$  der Lambda-DNA in 1 Stunde vollständig schneiden kann. Die Reaktionstemperaturen, -zeiten und Puffer richten sich nach Angaben der Hersteller der verwendeten Restriktionsendonukleasen (Sambrook *et al.* 1989).

#### 4.1.11 Dephosphorylierung von freien 5'-Enden

Diese Reaktion wird angewendet, um bereits linearisierte Vektoren an den 5'-Enden zu dephosphorylieren, um eine Religation zu verhindern. Dazu werden 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Vektor-DNA, 1/10 V 10x Dephosphorylierungs-Puffer und 1 U Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIP) zusammen 30 min. bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird wiederum 1 U CIP zum Ansatz gegeben und dieses bei 56 °C für 30 min. inkubiert. Darauf folgt eine DNA-Präzipitation mit Ethanol (Gassen & Schrimpf 1999).

#### 4.1.12 Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren

Für die Ligation zweier DNA-Fragmente müssen die Fragment-Enden (z. B. Vektor und Insert) miteinander kompatibel sein. Dies erreicht man, wenn die beiden Bestandteile mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten werden. Dazu werden geschnittene Vektor-DNA, geschnittene Insert-DNA, 1/10 V 10 x-Ligationspuffer und 1 U Ligase zusammengegeben. Dieser Ansatz wird entweder 1 Stunde bei 22 °C oder über Nacht bei 16 °C inkubiert. Zur Orientierung für die einzusetzende Insert-Menge kann folgende Formel verwendet werden, um eine äquimolare Menge an Vektor und Insert einzusetzen:  $[50 \text{ bzw. } 100 \text{ ng Vektor} \cdot \text{Insertlänge} / \text{Vektorlänge}] = \text{ng einzusetzendes Insert}$  (Gassen & Schrimpf 1999).

### 4.2 Arbeiten mit *Drosophila melanogaster*

#### 4.2.1 Die Haltung und Zucht von Fliegen

Zur Fliegenzucht werden Plastikröhrchen mit einem Durchmesser von 3,5 cm verwendet, verschlossen mit einem Stopfen. Die Röhrchen sind als Futter für die Larven zu etwa einem Drittel mit Maisgriesagar gefüllt. Die Nahrung für adulte Fliegen ist Trockenhefe, die beim Zusetzen der Fliegen hinzugefügt wird. Die Stammhaltung der Fliegen erfolgt in Klimakammern von 18 °C bis 25 °C. Zur Haltung der Fliegen werden sie alle 2 bis 3 Wochen auf frische Röhrchen gesetzt. Zur stärkeren Vermehrung erfolgt das Umsetzen in kürzeren Intervallen. Für Kreuzungsexperimente werden die Fliegen zur Auswahl mit Kohlendioxid (CO<sub>2</sub>) betäubt.



#### 4.2.2 Sammeln von Fliegenembryonen

Für die Eiablage werden Röhrchen verwendet, welche mit Fruchtsaftagar gefüllt sind. Als Nahrung für die Fliegen wird Trockenhefe zugegeben. Nach gewünschter Ablagezeit werden die Röhrchen durch Frische ersetzt. Die Fixierung der Ablagen sollte spätestens nach 3 Tagen erfolgen.

#### 4.2.3 Fixierung von Fliegenembryonen

Die Embryonen werden mit einem Pinsel und TNX von den Röhrchen abgelöst und in ein Netzchen überführt. Nach mehrmaliger Spülung mit TNX erfolgt die Dechorionisierung der Embryonen mit einer 1:1-Mischung aus Klorix und Wasser. Nach ca. drei Minuten erscheint die Oberfläche der Embryonen glänzend und die Dechorionisierung ist abgeschlossen. Durch Waschen mit TNX wird die Reaktion gestoppt. Anschließend erfolgt die Fixierung. Die Fixiermethode hängt von der Wahl des zu nutzenden Antikörpers ab.

**Fixierung mit Para-Formaldehyd** Die dechorionisierten Embryonen werden mit einem Pinsel in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit 500 µl Heptan und 500 µl 4% F-PBS versetzt und 5 bis 15 min. stark schüttelnd inkubiert. An der Phasengrenze zwischen Heptan und dem F-PBS findet die Fixierung statt und dort sammeln sich die fixierten Embryonen. Zur Entfernung des restlichen Paraformaldehyds muss mehrmals mit Heptan gewaschen werden. Anschließend wird die gesamte Lösung entfernt. Nun werden 500 µl Heptan und 500 µl Methanol hinzugegeben und für ca. 50 sec. sehr stark geschüttelt (Vortexer). Hierbei wird die Vitellinmembran entfernt. Nach langsamen Absinken der Embryonen werden die Lösungen aus dem Überstand abgenommen und die Embryonen mehrmals mit Methanol gewaschen. Die Lagerung erfolgt bei 4 °C in Methanol.

**Hitze-fixierung** Die dechorionisierten Embryonen werden im Netzchen für möglichst genau 10 Sekunden in kochendem PBT inkubiert und anschließend sofort in eiskaltes PBT überführt. Dann werden die Embryonen in ein Eppendorfreaktionsgefäß transferiert. Es folgt die Devitellinisierung, indem 500 µl Heptan und 500 µl Methanol hinzugegeben und die Embryonen für 50 sec. stark geschüttelt werden. Die Embryonen müssen vollständig nach unten gesunken sein, bevor die Lösung auf dem Überstand entfernt werden kann. Anschließend wird mehrmals mit Methanol gewaschen und die Embryonen können dann in Methanol für einen längeren Zeitraum bei -20 °C bis 4 °C gelagert werden.

#### 4.2.4 P-Element-Keimbahntransformation

(Rubin & Spradling 1982a,b)

**Vorbereitung der Embryonen** 3-5 Tage alte *white*-Fliegen werden auf Ablage bei 18 °C gehalten. Die Fruchtsaftagar-Schalen werden alle 30 min. gewechselt und die vorhandenen Embryonen

sofort in ein feinmaschiges Metallsieb überführt und dechorionisiert. Anschließend werden sie mit einem Pinsel auf einen rechteckigen Apfelsaftagar-Block überführt und mit einer Präpariernadel mit dem anterioren Pol zur Blockkante hin ausgerichtet. Nun wird ein mit Klebstoff bestrichenes Deckgläschen leicht auf die Embryonen gedrückt und die Embryonen so auf dem Deckgläschen fixiert. Um den Innendruck der Embryonen für die Injektion zu verringern, werden diese 8-12 min. im Exikator über Kieselgel getrocknet. Die Embryonen überschichtet man anschließend mit Voltalef-Öl, um ein Austrocknen zu verhindern.

**Mikroinjektion Injektionspuffer** Die Injektionsnadel ist aus einer Glaskapillare (1,2 mm Durchmesser), manuell mit einem Kapillarzyehgerät herausgezogen, hergestellt. Diese Nadel wird mit dem vorher bei 30 min. bei 13000 UpM zentrifugierten Injektionsansatz befüllt. Der Ansatz besteht aus 0,5 µg/µl DNA, 0,5 µg/µl Injektionspuffer und 0,5 µg/µl Helferplasmid pπ25.7wc. Die befüllte Kapillare verbindet man mit dem Drucksystem der Mikroinjektionsapparatur und befestigt diese am Mikromanipulator. Die Kapillare wird in den posterioren Pol des Embryos eingeführt und die DNA-Lösung injiziert. Embryonen, bei denen die Polzellen schon erkennbar sind, werden durch seitliches Aufreißen mit der Nadel abgetötet, da hier keine Keimbahntransformation mehr möglich ist. Nach der Injektion aller Embryonen wird das Deckgläschen mit Voltalef-Öl beschichtet, in eine Petrischale mit Apfelsaftagar und Wasser überführt und bei 25 °C inkubiert, bis die Larven schlüpfen. Diese Larven werden mit einer Präpariernadel abgesammelt und in Fliegenflaschen mit Zuchtmedium überführt. Diese werden bei 25 °C bis zum Schlüpfen der adulten Fliegen inkubiert.

**Selektion transformierter Fliegen** Die injizierten DNA-Konstrukte besitzen zur Selektion transformierter Fliegen unter anderem das *white*-Gen enthalten. So ist in der G1-Generation bei erfolgter Transformation eine rote Augenfarbe zu beobachten. Die injizierten Fliegen werden zuerst direkt nach dem Schlüpfen als G0 abgesammelt und in Einzelpaarzuchten mit *white*-Fliegen gekreuzt. In den Nachkommen dieser Kreuzungen können die transformierten Individuen durch eine hellgelbe bis rote Augenfarbe erkannt werden. Es folgt eine weitere Verpaarung mit *white*-Fliegen und anschließend, um Mehrfachinsertionen zu eliminieren, eine weitere Kreuzung von virginellen, rotäugigen Weibchen mit *white*-Männchen. Ab dann können die heterozygoten Tiere untereinander weitergekreuzt werden, bis homozygote Tiere durch ihre dunklere Augenfarbe zur Etablierung stabiler Linien weitergezüchtet werden können.

#### 4.2.5 Das UAS-Gal4-System

Das UAS-GAL4 System ermöglicht die zeit- und gewebespezifische Expression von Genprodukten in *Drosophila*. Dieses System beruht darauf, daß die Expression des Hefetranskriptionsfaktors GAL4 unter die Kontrolle eines Promotors gestellt wird, welcher in den gewünschten Geweben zur gewünschten Zeit aktiv ist. Das UAS-Promotorelement wird durch die Bindung von GAL4 aktiviert und kann seinerseits die Transkription von dahinter liegenden kontrollierten Genen aktivieren (Abb. 10). Das GAL4 ist zusätzlich in der Lage, Transgene zu exprimieren, die unter der Kontrolle des

UAS-Promotorelementes (UAS = upstream activating sequence) stehen. Sowohl das GAL4- als auch das UAS-Konstrukt liegen in verschiedenen transgenen Fliegenstämmen vor. Durch deren Kreuzung werden sie in den gleichen genetischen Hintergrund gebracht und der Effekt der ektopischen Expression ist in den Nachkommen zu beobachten (Brand & Perrimon 1993).

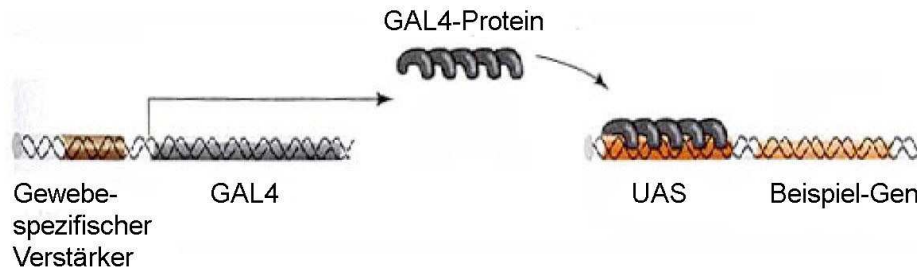


Abbildung 10: **Das UAS-GAL4 System.** Für eine zeit- und gewebespezifische Expression von Genen werden zwei Fliegenlinien miteinander gekreuzt, welche unterschiedliche Konstrukte tragen. Die eine Fliegenlinie trägt den Hefe-Transkriptionsfaktor GAL4 unter der Kontrolle eines gewebespezifischen Verstärker-Elementes. Die zweite Fliegenlinie trägt das zu exprimierende Beispiel-Gen unter der Kontrolle des GAL4 responsiven UAS-Promotors. In den Zellen, in denen GAL4 exprimiert wird, kann dieses über die UAS-Sequenz die Transkription des Beispiel-Gens aktivieren (Abb. nach Brand & Perrimon, 1993).

## 4.3 Histologische Methoden

### 4.3.1 Immunhistochemische Färbung nach der ABC-Methode

Bei der ABC (Avidin-Biotin-Complex)-Methode wird ein an das Antigen gebundener, nicht-markierter Erstantikörper von einem biotinylierten Zweitantikörper erkannt und gebunden. Die zusätzliche Anlagerung eines Komplexes aus Avidin und biotinylierter Merrettichperoxidase an die Biotinmoleküle des Zweitantikörpers über freie Biotin-Bindestellen des Avidins bewirkt eine verstärkte enzymatische Reaktion. Es wird durch Zugabe von Wasserstoffperoxid eine Färbereaktion gestartet, bei der das Chromogen DAB (Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid) oxidiert wird. Die Färbung erhält eine braune Farbe, aber bei Zugabe von Nickelchlorid wird eine Schwarzfärbung erreicht. Das Methanol wird von den fixierten Embryonen abgenommen und mehrmals kurz mit PBT gewaschen. Nach einem längeren Inkubationsschritt mit PBT werden 200-500 µl des mit PBT verdünnten Erstantikörpers zu den Embryonen gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend werden die Embryonen dreimal 10 min. mit PBT gewaschen und dann zur Blockierung unspezifischer Bindungen 30 min. mit ZS-PBT (2 % Ziegenserum in PBT) gewaschen. Parallel dazu werden fixierte Wildtyp-Embryonen rehydriert und der zu benutzende Zweitantikörper ebenfalls zur Blockierung unspezifischer Bindungen für 30 min. in ZS-PBT inkubiert. Der Zweitantikörper wird dann in einer 1:500 Verdünnung auf die zu färbenden Embryonen gegeben und 60 bis 90 min. inkubiert. Dann wird dreimal 10 min. mit PBT gewaschen, während der Komplex aus Avidin und Peroxidase anzusetzen

ist, welcher 30 min. vorinkubieren muss. Dazu werden 2 µl Lösung A und 2 µl Lösung B mit 250 µl PBT gemischt. Der Komplex wird auf die Embryonen gegeben und für 30 min. inkubiert. Anschließend wird der Komplex abgezogen und die Embryonen dreimal 10 min. mit PBT gewaschen. Für die Färbung werden die Embryonen mit 600 µl PBT in ein silikonisiertes Blockschälchen überführt und 10 µl DAB (10 mg/ml) sowie 2 µl 10 %iges Nickelchlorid (optional) und 10 µl 0,3 %iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hinzugefügt. Nach ausreichender Färbung wird die Färbung durch Waschen mit PBT beendet und sämtliche DAB-Abfälle in Klorix-Haushaltsreiniger neutralisiert. Zur Herstellung von Dauerpräparaten werden die Embryonen in absoluten Ethanol gewaschen und anschließend in Epon eingebettet (Lawrence & Johnston 1989).

#### **4.3.2 Immunofluoreszenzfärbungen**

Die fixierten Embryonen werden nach Entfernung des Methanols in PBT rehydriert und der Erstantikörper in ausreichender Verdünnung bei über Nacht 4°C auf den Embryonen inkubiert. Anschließend werden die Embryonen dreimal 10 min. in PBT gewaschen und in ZS-PBT geblockt, bevor der Zweitantikörper in einer 1:100-Verdünnung hinzugegeben wird. Der Zweitantikörper ist direkt mit einem Fluoreszenzmarker gekoppelt. Alle folgenden Schritte werden nun im Dunkeln durchgeführt. Die Inkubation mit dem Zweitantikörper erfolgt bei Raumtemperatur für 60 bis 90 min.. Anschließend werden die Embryonen mehrmals mit PBT gewaschen und in Fluoromount-G eingebettet. Diese Präparate eignen sich im Gegensatz zu in Epon eingebetteten Präparaten allerdings nicht als Dauerpräparate.

#### **4.3.3 Tyramid-Signal-Verstärkung (Tyramide-Signal-Amplification - TSA)**

Zeigen die Färbungen nach Inkubation mit einem direkt Fluoreszenzmarker-gekoppelten Zweitantikörper eine zu schwache Färbung, wird eine Verstärkung mit dem TSA-System durchgeführt. Dazu werden die Embryonen zunächst mit einem biotinylierten Zweitantikörper für 2 Stunden inkubiert und nach mehrfachem Waschen für 60 min. mit 500 µl vorinkubierte AB-Lösung (2 µl Lösung A und 2 µl Lösung B in 250 µl PBT) gemischt. Nach 4x 10 min. waschen mit PBT wird das TSA-Gemisch (2 µl Fluorescein in 100 µl „Amplification diluent“) hinzugegeben und 20 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mehrfachem Waschen mit PBT werden die Embryonen in Fluoromount-G eingebettet. Zusätzlich ist das TSA-Verstärker-Kit auch für immunhistochemische Färbungen mit DAB verwendbar. Hier wird der biotinylierte Zweitantikörper nach Präadsorption für 2 Stunden oder über Nacht nach erneutem Blocken auf die Embryonen gegeben. Nach mehrfachem Waschen wird der vorinkubierte AB-Komplex für 60 min. auf die Embryonen gegeben. Nach vier Waschschritten je 10 min. mit PBT wird das TSA-Gemisch (3 µl biotinyliertes Tyramid-Reagent in 150 µl Amplifikations-Verdünnungspuffer) hinzugegeben und 20 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgen anschließend drei bis fünf Waschschritte zu 10 min. und die Färbung mit 10 µl DAB, 2 µl 10 %iges Nickelchlorid (optional) und 10 µl 0,3%iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Bei ausreichender Färbung wird die Reaktion mit PBT abgestoppt, mehrmals mit PBT gewaschen und in absoluten Ethanol entwässert.

#### 4.3.4 In situ-Hybridisierungen an *Drosophila*-Embryonen

**Markierung einer RNA-Sonde mit DIG-UTP** Zu Beginn wird eine RNA-Sonde hergestellt, indem 3-5 µg einer cDNA durch entsprechende Restriktionsendonukleasen linearisiert wird. Nach Kontrolle auf einem Agarosegel wird die Sondenreaktion durchgeführt. Optional kann zuvor eine Ethanolpräzipitation zur Reinigung der DNA durchgeführt werden. Zur Sondenreaktion wird 1 U der entsprechenden Polymerase hinzugefügt, 2 µl des DIG-RNA Labelling-Mix, 2 µl Transkriptionspuffer und 1 µg der linearisierten DNA. Die Reaktion wird mit destilliertem Wasser auf 20 µl Endvolumen aufgefüllt und 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird eine Ethanol-Präzipitation durchgeführt, wobei das Endvolumen 50 µl betragen sollte.

**Sonden-Test (Spot-Test)** Um zu testen, ob die hergestellte Sonde eine ausreichende Reaktivität zeigt, werden drei Verdünnungen der Sonden (1:10, 1:100, 1:1000) auf eine Hybond-N-Membran getropft. Nach UV-Crosslinking zur Fixierung der DNA auf die Membran wird mit DIG1 kurz gewaschen und 5 min. mit DIG2 geblockt. Anschließend wird die Membran 30 min. mit dem DIG-Antikörper in einer Verdünnung von 1:5000 in DIG1 inkubiert. Es folgen zwei Waschschrte von je 5 min. mit DIG1 und eine kurze Äquilibration in DIG3. Nun wird die Färbelösung (2 ml DIG3, 10 µl NBT, 10 µl X-Phosphat) hinzugegeben und die Membran unter Lichtabschluss inkubiert. Die Verdünnung der Sonde für anschließende *in situ*-Hybridisierungen kann nach der Beendigung der Färbung durch Abstoppen mit Leitungswasser anhand der unterschiedlich starken Färbung der angewendeten Verdünnungen ermittelt werden.

**Hybridisierung und Färbung** Zur Hybridisierung werden die Embryonen 30 min. in PBT gewaschen und anschließend für 10 min. in einem Gemisch aus PBT/HS (1:1) gewaschen. Nach einer 10 minütigen Inkubation in HS bei Raumtemperatur werden die Embryonen in neuem HS in einen Heizblock mit der gewählten Hybridisierungstemperatur (Ideal: 55-60°C) gestellt. Dort sollten die Embryonen ca. 60 min. inkubieren bevor die Sonde hinzugegeben ist. Dazu muss die Sonde in der entsprechenden Verdünnung 15 min. in einem 100 °C-Wasserbad kochen. Vor Zugabe der Sonde zu den Embryonen wird die HS-Lösung abgenommen. Die Hybridisierung erfolgt über Nacht im Heizblock (Ideal: 16 Stunden). Am folgenden Tag werden die Embryonen dreimal 20 min. in vorgewärmter HS gewaschen, anschließend einmal 20 min. in PBT/HS (1:1) und fünfmal 10 min. in PBT. Während dieser Waschschrte wird der α-DIG-Antikörper an WT-Embryonen (Dummies) in einer Verdünnung von 1:50 präadsorbiert. Der Antikörper wird in einer Endverdünnung von 1:2000 zu den Embryonen gegeben und bis zu zwei Stunden inkubiert. Es folgen drei Waschschrte von je 10 min. mit PBT und drei Waschschrte in DIG3 (+0,1 % Tween20). Anschließend kann die Färbereaktion gestartet werden, wobei die Färbelösung folgendermaßen zusammengemischt wird: 1 ml DIG3 (+0,1 % Tween20), 3,5 µl NBT, 3,5 µl X-Phosphat. Die Färbung erfolgt unter Lichtabschluss und ist in regelmäßigen Zeitabständen zu kontrollieren. Bei ausreichender Färbung wird die Reaktion unter Zugabe von PBT abgestoppt und mit Ethanol entwässert. Die Embryonen können anschließend in EPON eingebettet werden.

#### 4.3.5 Herstellung von Epon-Dauerpräparaten

Die im Materialteil aufgeführten Epon-Komponenten werden zusammen in ein Gefäß gemischt, wobei darauf geachtet werden sollte, dass sich keine Bläschen bilden. Nach vollständiger Vermischung durch leichtes Rühren kann die viskose Flüssigkeit in kleine Reaktionsgefäße aliquotiert werden. Die Aufbewahrung erfolgt bei -20 °C.

Die in absoluten Ethanol gelagerten Embryonen werden mit etwas Ethanol auf ein Objektträger transferiert. Anschließend wird ein Tropfen Epon hinzugefügt und die Embryonen mit Hilfe einer Präparier-Nadel gleichmäßig auf dem Objektträger verteilt. Nachdem ein Deckgläschen möglichst luftblasenfrei aufgelegt wurde, härtet das Präparat für mindestens 24 Stunden bei 60 °C aus. Im Anschluss ist die Analyse am Lichtmikroskop möglich.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Die EMS-Mutante *E832 (P3-106/2)* zeigt deutliche Störungen im somatischen und viszeralem Mesoderm von *Drosophila melanogaster*

Die Entwicklung der larvalen Muskulatur von *Drosophila melanogaster* ist ein während der Embryogenese durch verschiedene Signalwege regulierter Prozess. Von der Spezifizierung des Mesoderms über die Determination der Myoblastenzelltypen bis zur Fusion der Zellen zu synzytialen Muskelfasern sind viele Faktoren bereits bekannt und charakterisiert (siehe Abb. 1 und 5). Trotzdem sind die meisten Prozesse noch nicht vollständig geklärt. Aufgrund dessen durchmusterte PD Dr. Anne Holz (AG Renkawitz-Pohl) im Vorfeld dieser Arbeit ein EMS-Mutagenese-Screen aus dem Labor von Prof. Dr. Christian Klämbt (Münster) auf Mutationen in der Muskulatur hin (Hummel *et al.* 1999a,b), wobei u. a. bereits die Funktion von Kette während der Myogenese aufgedeckt werden konnte (Schröter *et al.* 2004). Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung einer weiteren Mutante aus diesem Screens und der Identifikation des mutierten Gens hinsichtlich seiner Funktion während der Myogenese. Das Chromosom *E832 (P3-106/2)* wurde bereits im Vorfeld dieser Arbeit in zwei Diplomarbeiten einleitend untersucht (Reichert 2004; Wierach 2005). Nina Reichert führte 2004 eine Lokalisationsanalyse und eine erste phänotypische Charakterisierung durch. Dabei lokalisierte sie *E832 (P3-106/2)*, im Folgenden abkürzend *E832* bezeichnet, auf den linken Arm des zweiten Chromosoms (Reichert 2004). In der Diplomarbeit von Barbara Wierach 2005 (jetzt Griemert) erfolgte eine weitere Eingrenzung und weiterführende Analysen des mutanten Phänotyps (Wierach 2005). Die nachfolgenden Kapitel befassen sich mit der daran anschließenden Untersuchung der Mutante, der Identifikation der verursachenden Mutation sowie weiteren Analysen bezüglich der Funktion des betreffenden Gens.

#### 5.1.1 Die Entwicklung des somatischen Mesoderms ist in *E832* gestört

Die somatische Muskulatur kann mit dem  $\beta$ 3-Tubulin-Antikörper, einem muskelspezifischen Tubulin-Isotyp sichtbar gemacht werden. Im Wildtyp ist in Stadium 16/17 deutlich die geordnete Struktur der Segmente mit der spezifischen Anzahl von Muskeln zu erkennen (Abb. 11, A). In *E832* erscheint diese Einteilung gestört, die Muskeln sind gelegentlich über die Segmentgrenzen hinaus angeordnet und insgesamt ist das Muskelmuster ungewohnt und lückenhaft (Abb. 11, B-F). Nur in einigen Fällen sind die Segmentgrenzen zu erkennen (Abb. 11, D und E). Die Muskeln sind dünner (Abb. 11, Pfeile in B - F) und die verschiedenen Muskeltypen in den meisten Fällen nicht mehr eindeutig zu identifizieren (z. B. Abb. 11, B und E), da sie häufig nicht mehr an der vorgesehenen Stelle an die Epidermis angeheften. Ein Beispiel ist der 'Lateral oblique 1' (LO1)-Muskel, welcher das gesamte Segment überspannt (Abb. 11, A) und der in den Mutanten nicht mehr eindeutig zu identifizieren ist (Abb. 11, B bis E). Die Auswahl der Embryonen in Abbildung 11 macht darüber hinaus deutlich, dass der somatische Muskelphänotyp in *E832* variabel ist. So scheint das Muskelmuster des Embryos in Abb. 11 F nicht so stark deformiert zu sein wie in B oder E. Neben der gestörten Morphologie fehlen

in einigen Fällen Muskeln, sichtbar anhand von Löchern im Muskelmuster (Abb. 11, Pfeilköpfe in B - F). Allerdings fehlen in den unterschiedlichen Embryonen nicht die gleichen Muskeltypen, vielmehr variiert dies ebenfalls (Abb. 11, vergleiche D mit E und F). Die Position der Löcher ist in den überwiegenden Fällen dorsal und zieht sich bis weit in den lateralen Bereich.

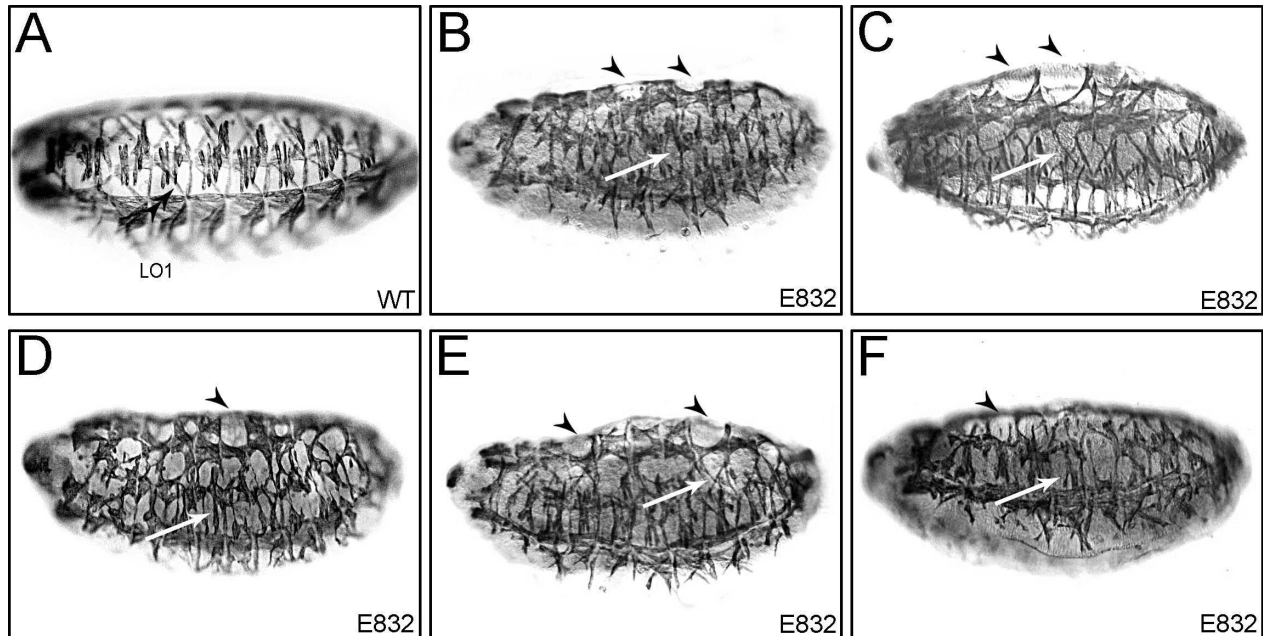


Abbildung 11: **Die EMS-Mutante *E832* zeigt Defekte in der somatischen Muskulatur des Embryos.** Die Muskulatur in Stadium 15/16 ist dargestellt mit dem  $\alpha\beta 3$ -Tubulin-Antikörper und im Wildtyp ist das repetitive Muster der Muskelfasern je Segment zu erkennen (A). Der Muskel 'Lateral oblique 1' (LO1) ist hier besonders hervorgehoben (Doppelpfeilkopf und LO1 in A). Dieses sich wiederholende, geordnete Muster scheint in *E832*-Mutanten gestört und die Muskeln sind dünner (Pfeile in B bis F). Während der Dorsalschluss in allen Embryonen korrekt verläuft, sind überwiegend dorsal und auch lateral Löcher im Muskelmuster zu beobachten (Pfeilköpfe). Der LO1-Muskel kann in den meisten Fällen nicht mehr identifiziert werden.

Im Folgenden wurden die beiden Myoblasten-Zelltypen mit  $\alpha$ -D-Mef2,  $\alpha$ -Lame duck (Lmd) und zusätzlich mit  $\alpha$ - $\beta$ -Galaktosidase an der 'Enhancer-Trap'-Linie rP298*lacZ* an *E832*-Embryonen in ihrer Entwicklung betrachtet. Die Situation der somatischen FCMs ist mit  $\alpha$ -Lmd sichtbar zu machen. Der Transkriptionsfaktor Lmd ist ab Stadium 8/9 in den FCMs exprimiert und eine Lmd-Expression erlaubt somit eine Aussage über die Determination dieses Zelltyps. Im Wildtyp sind die beiden Bänder der zukünftigen somatischen bzw. viszeralen Muskulatur zu erkennen (Abb. 12, A). Diese Anordnung ist in *E832* noch deutlich vorhanden, aber es sind in einigen Embryonen kleine Unterbrechungen im viszeralen mesodermalen Band zu erkennen, was auf einen Defekt in der Entwicklung der viszeralen Myogenese hindeutet, wobei dies im folgenden Kapitel näher betrachtet wird (Abb. 12, Pfeilkopf in B). Die somatischen FCMs scheinen normal differenziert zu sein (Abb. 12, C).

D-Mef2 ist ein Transkriptionsfaktor, welcher ab dem frühen Mesoderm von allen Myoblastenvorläufern exprimiert wird und so die gesamte Myoblastenpopulation charakterisiert. Hier ist zu erkennen,



dass im Vergleich zum Wildtyp das Muster der D-Mef2-positiven Zellkerne somatisch sehr viel unregelmäßiger erscheint (Abb. 12, D - F). Die Anzahl der Kerne ist geringer als im Wildtyp, was aber durch die ungeordnete Anordnung nur so erscheinen kann. Ebenso sind in dieser Färbung die Unterbrechungen im somatischen Mesoderm gut zu erkennen (Abb. 12, Pfeile), wie dies bereits für  $\alpha$ - $\beta$ 3-Tubulin-Färbungen beschrieben wurde.

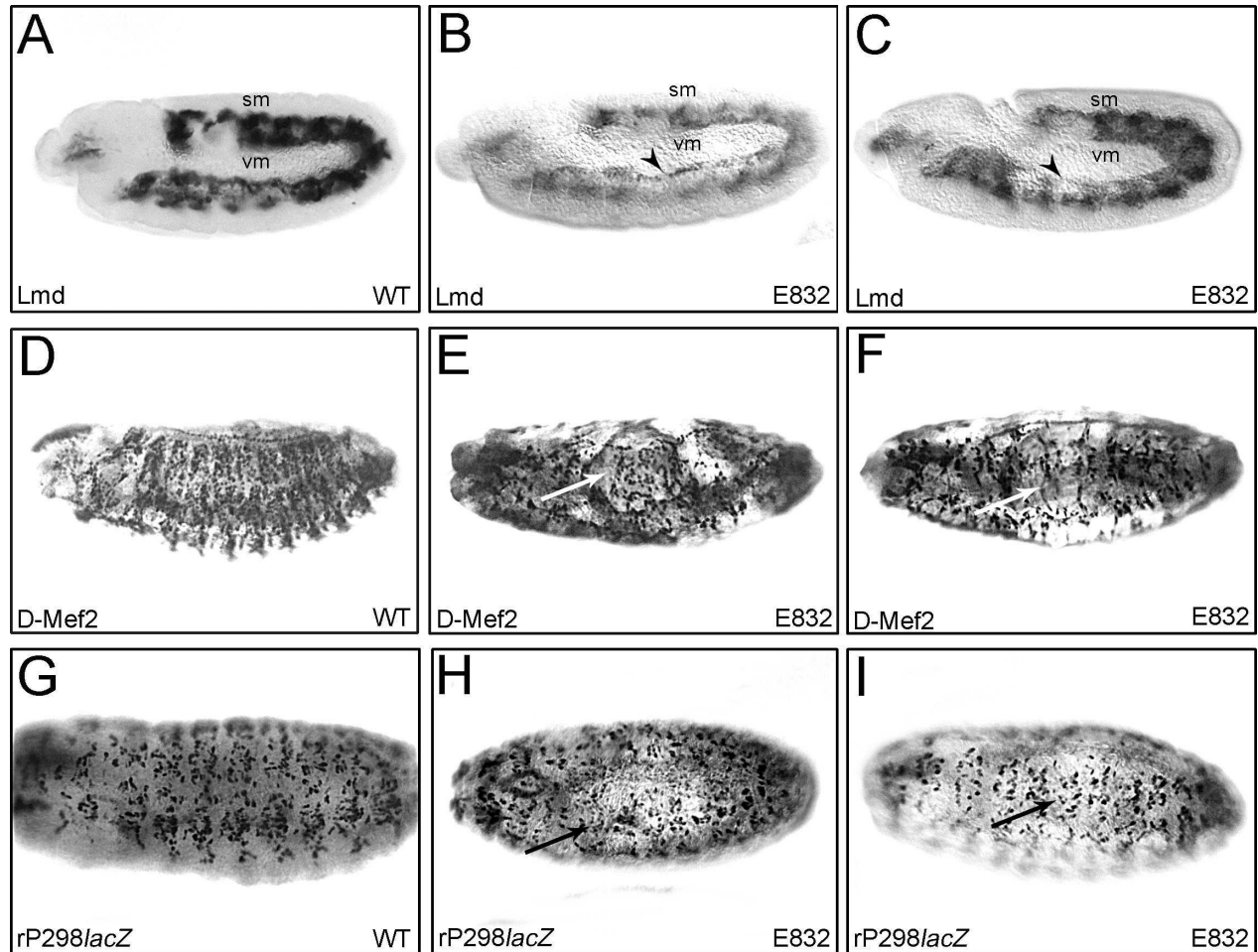


Abbildung 12: Die *rP298lacZ*-positiven Kerne sind in *E832*-Embryonen ab Stadium 15/16 reduziert, während die somatischen FCMs in Stadium 9/10 normal gebildet werden. In  $\alpha$ -Lmd-Färbungen ist in Stadium 9/10 eine normale Verteilung der somatischen FCMs (B und C) im Vergleich zum Wildtyp (A) zu sehen, während im viszeralen mesodermalen Band einige Unterbrechungen erkennbar sind (Pfeilkopf in B). In  $\alpha$ -D-Mef2-Färbungen erscheinen in Embryonen der Stadien 15/16 im Vergleich mit dem Wildtyp (D) die gleichen unstrukturierten Anordnungen wie bei  $\alpha$ - $\beta$ 3-Tubulin-Antikörperfärbungen (E und F). Ebenso erscheinen im lateralen Bereich Unterbrechungen im Muskelmuster (Pfeile in E und F).  $\alpha$ - $\beta$ -Galaktosidase-Nachweise an *E832*-Embryonen in den Stadien 15 bis 16, sichtbar gemacht mit dem 'Enhancer-Trap' *rP298lacZ*, zeigen eine fehlerhafte Kern-Anordnung im Vergleich zum Wildtyp und eine Verringerung *rP298lacZ*-positiver Zellkerne (vgl. G mit H und I). Die Pfeile markieren hier die Bereiche fehlender *rP298lacZ*-positiver Zellen (H und I).

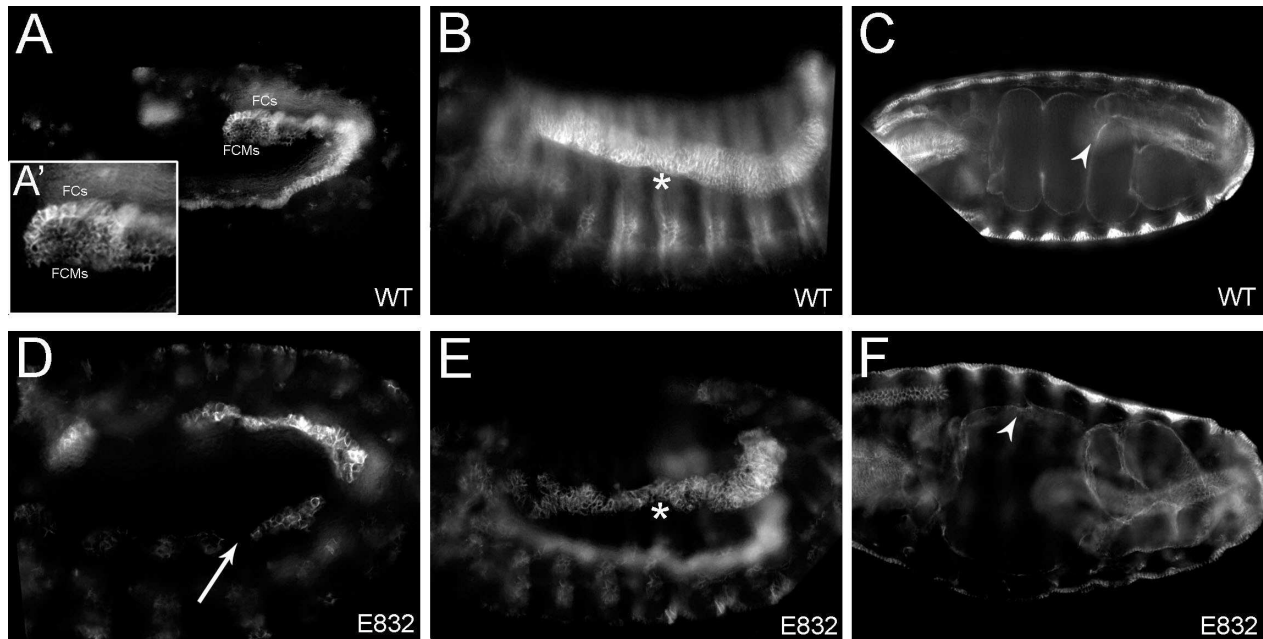
rP298*lacZ* ist eine 'Enhancertrap-Linie', bei dem das *lacZ*-Gen unter der Kontrolle des Promotors von Duf/Kirre steht und sich so mit Hilfe von  $\alpha$ - $\beta$ -Galaktosidase die FCs darstellen lassen. Die Anzahl der rP298*lacZ*-positiven Zellen ist in Stadium 16 im Vergleich zum Wildtyp reduziert und die Verteilung dieser Zellen im Hemisegment erscheint unregelmäßig (Abb. 12, G bis I). Ebenso sind die bereits beschriebenen Unterbrechungen zu beobachten (12, Pfeile in H und I). Wie bei D-Mef2 ist eine Reduktion der *lacZ*-positiven Zellen zu erkennen, nur erscheint hier die Reduktion wesentlich deutlicher zu erkennen, und es kann davon ausgegangen werden, dass dies nicht an der fehlerhaften Anordnung liegt. Eine statistische Auswertung ist ebenso wie bei einer  $\alpha$ -D-Mef2-Färbung nicht empfehlenswert, da es sich in den relevanten Stadien um viele Kerne im Wildtyp pro Segment handelt und sich nicht immer alle Zellkerne im Fokus befinden. Dadurch kann nicht die reelle Anzahl der rP298*lacZ*-positiven Zellen ermittelt werden.

Zunächst muss nun geklärt werden, ob eines oder mehrere Gene auf dem *E832*-Chromosom mutiert sind und so zu dem beschriebenen Muskel-Defekt beitragen. Es ist zu betonen, dass die EMS-induzierte Mutante *E832* deutlich in der Entwicklung der somatischen Muskulatur gestört ist. Neben einer Veränderung in der Anordnung der fertigen Muskeln wurde gezeigt, dass es sich hierbei um ein Problem auf der Ebene der FCs handeln könnte, da deren Anzahl gegenüber dem Wildtyp reduziert scheint. Die mit  $\alpha$ -Lmd markierten somatischen FCMs sind zumindest größtenteils normal determiniert zu sein.

### 5.1.2 Die Entwicklung des viszeralen Mesoderms in *E832* entspricht nicht der Wildtyp-Situation

Neben der somatischen entsteht die viszerale Muskulatur aus der Fusion von FCs mit FCMs, weshalb diese Entwicklung hier untersucht werden soll. Auch im viszeralen Mesoderm ist eine Veränderung in *E832* im Vergleich zum Wildtyp zu beobachten. Die ersten Hinweise sind bereits im Kapitel 5.1.1 beschrieben, wo bei  $\alpha$ -Lmd-Färbungen das viszerale Band der FCMs unterbrochen scheint (Abb. 12, B). Bei Betrachtung der Bilder E in Abb. 11 bzw. Abb. 12, fällt ein aufgeblähter Darm und die deformierte Form des Embryos auf. Mit Hilfe einer  $\alpha$ -FasciclinIII (FasIII)-Färbung ist die Situation im viszeralen Mesoderm analysierbar. FasIII ist ein Zelladhäsionsmolekül (Snow *et al.* 1989) und wird in frühen Stadien fast ausschließlich in den Zellen der zukünftigen viszeralen zirkulären Muskulatur exprimiert. Wie in Abb. 13 gezeigt, liegen die viszeralen zirkulären FCs im Wildtyp als eine Zellreihe mit einer starken FasIII-Expression angrenzend an die weiter innen liegenden viszeralen FCMs mit einer schwächeren FasIII-Expression. Ebenso ist die Morphologie der Zelltypen zu erkennen. Während die FCs eine Pallisadenform haben, sind die FCMs globulär geformt (Abb. 13, A und Vergrößerung in A'). Nach der ersten Fusion von FCs mit den FCMs während des Keimstreifrückzugs ab Stadium 13/14 sind die zirkulären viszeralen Muskelvorläufer als Band mit länglichen, gut unterscheidbaren Zellen vorhanden (Abb. 13, Sternchen in B). In Stadium 15/16 wird der Darm ausgebildet und die Konstriktionen sind sichtbar (vergleiche Abb. 13, C). In *E832*-Mutanten ist das frühe viszerale mesodermale Band in Stadium 9/10, wie schon bei Lmd-Färbungen ersichtlich, in einer Vielzahl von Embryonen unterbrochen (Abb. 13, D Pfeil). Die Zelltypen, FCs und FCMs,

können nicht mehr gut identifiziert werden (Abb. 13, E). Einzelne Embryonen weisen hingegen ein nicht unterbrochenes Zellband auf. Allerdings erscheint hier die Morphologie ebenfalls nicht wildtypisch (Daten nicht gezeigt). Diese fehlerhafte Struktur setzt sich in den späteren Stadien fort, so dass nach dem Keimstreifrückzug das Band zirkulärer Muskelvorläufer sehr unregelmäßig gebildet wird (Abb. 13, E Stern). Färbungen an *E832*-mutanten Embryonen späterer Stadien zeigen keine wildtypische Darmstruktur, vielmehr scheinen die Konstriktionen entweder verzögert oder nur unvollständig gebildet zu werden (Abb. 13, vergleiche C mit F). Da in den Lmd-Färbungen eindeutig FCMs nachgewiesen sind, ist deshalb folgend zu analysieren, ob die Gesamtzahl der Myoblasten im viszeralen Mesoderm verändert ist.



**Abbildung 13: Das viszerale Mesoderm in *E832*-homozygoten Embryonen zeigt deutliche Störungen in seiner Differenzierung.** Im Wildtyp sind in  $\alpha$ -FasIII-Nachweisen die beiden Myoblastenpopulationen zu unterscheiden (FC - Founderzellen; FCM - fusionskompetente Myoblasten), da hier eine unterschiedlich starke Expression von FasIII in Stadium 9/10 in den FCs und FCMs zu erkennen ist (A und vergrößert in A'). Im Laufe der Entwicklung entsteht durch Fusionen bis Stadium 14 erst ein viszerales Band aus zirkulären viszerale Muskeln (Stern in B), worauf schließlich in Stadium 16 eine voll ausgebildete viszerale Muskulatur den Darm umschließt (C, Pfeilkopf zeigt eine Konstriktion). In *E832*-Mutanten ist die geordnete Struktur der Myoblasten in Stadium 10 nicht mehr vorhanden (D) und das viszerale Band in Stadium 13/14 unterbrochen (Stern in E). Im späten Stadium 16 sind zwar Konstriktionen im Ansatz erkennbar (Pfeilkopf), aber der Darm ist eher ballonartig ausgeprägt (F).

Doppelfärbungen mit  $\alpha$ -FasIII und  $\alpha$ - $\beta$ -Galaktosidase an *rp298lacZ*-Embryonen im *E832*-mutanten Hintergrund ermöglichen, spezifische Myoblastentypen des zirkulären, viszerale Mesoderms gezielt zu analysieren. Wie bereits in der Abb. 13 dargestellt, bestätigt sich in einer solchen Doppelfärbung der zuvor bereits beschriebene Phänotyp. Im Wildtyp sind die beiden Myoblasten-Populationen zu identifizieren und die Founderzellen stellen nur die äußere Zellreihe dar (Abb. 14, A-C). Vergleicht

man hierzu die *E832*-Mutante, ist die Morphologie der Myoblasten nicht eindeutig zu erkennen, sowie das viszerale Band nicht durchgängig (Abb. 14, D - F Pfeile).

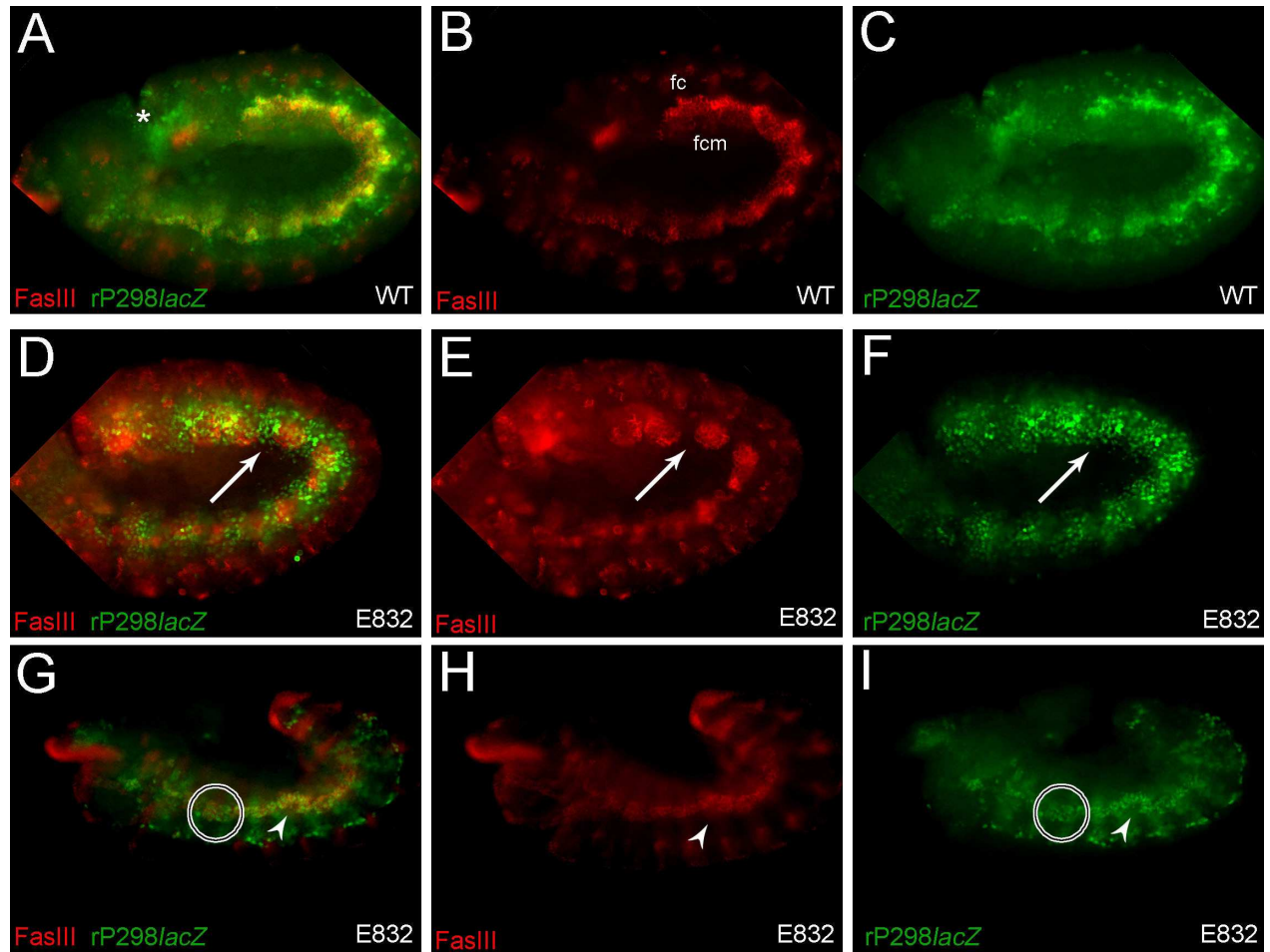


Abbildung 14: Die viszerale FCs in der Mutante *E832* erscheinen im Vergleich zum Wildtyp in ihrer Anzahl in Stadium 9/10 erhöht. Im Wildtyp sind in Stadium 9/10 die beiden Myoblastentypen durch ihre Morphologie und durch die unterschiedlich starke Expression von FasIII (rot) gut zu erkennen (A und B). Die rP298lacZ-positiven Zellen (grün) stellen die FCs dar und in der Überlagerung zeigt nur die äußere Zellreihe eine Koexpression (A bis C). Der Stern in A markiert die in grün dargestellten longitudinalen viszerale FCs. In *E832* ist die Morphologie der Zellen in Stadium 9/10 gestört und auch kein durchgängiges Band vorhanden (E). Die rP298lacZ-positiven Zellen scheinen über das gesamte viszerale Mesoderm verteilt zu sein und auch in den Bereichen, in denen keine FasIII-Expression zuerkennen ist (F). Die FCMs sind hier nicht deutlich erkennbar (D bis F). Ab Stadium 12/13 erscheint das viszerale Band zwar meist durchgängig, aber die Morphologie der Myoblasten ist nicht strukturiert (H). Das viszerale Mesoderm besteht im Wildtyp aus zwei Reihen mit FCs (siehe Abb. 13, B), was an einigen Stellen in *E832* nicht der Fall ist und mehr Reihen rP298lacZ-positiv FCs zu beobachten sind (G bis I, Kreise).

Eine Unterscheidung der FCs von den FCMs durch eine FasIII-Expression erscheint unmöglich. Ebenso scheinen die FCs und FCMs nicht so regelmäßig von außen nach innen angeordnet wie im Wildtyp. Der erhöhte Anteil von rP298lacZ-positiv Zellen weist dazu noch auf eine höhere Anzahl

von viszerale FCs hin (vergleiche. Abb. 14, A - C mit D - F). Allerdings treten auch rP298*lacZ*-positive Zellen an Stellen ohne FasIII-Färbung auf, was bedeuten kann, dass diese Zellen keine viszerale FCs sind. Möglicherweise handelt es sich hier um somatische FCs, wobei zu beachten ist, dass diese im Wildtyp erst ab Stadium 11 auftreten. Zu diesem Zeitpunkt kann daher nicht bestimmt werden, um welche Zellen es sich hier handelt. Durch die gestörte Ausbildung der FCs und FCMs wird die Entwicklung der fertigen Darmmuskulatur gestört, wie die unstrukturierte Anordnung der Myoblasten in Stadium 12/13 zeigt (Abb. 14, Pfeilköpfe in G - I). Während der Bildung der viszerale Muskulatur sind hier normalerweise zwei Reihen mit FCs zu erkennen. In *E832*-Mutanten scheinen mehr als zwei Reihen mit rP298*lacZ*-positiven Zellen vorhanden zu sein (Abb. 14, Kreise in G und I).

Zusammenfassend ist zu betonen, dass sich in der *E832*-Mutante eine Störung in der Entwicklung der viszerale Muskulatur vorliegt. Im Gegensatz zur möglichen Reduktion der somatischen rP298*lacZ*-positiven Kerne zeigt sich im viszerale Mesoderm indessen eine Erhöhung dieser Kerne. Die Menge der viszerale FCMs scheint auf den ersten Blick reduziert, obwohl die Entwicklung der viszerale Muskulatur recht weit fortschreitet, so dass der Darm weitestgehend vollständig von Muskeln umschlossen wird, wobei aber die Konstriktionsbildung verzögert erscheint. Weitere bestätigende Experimente erscheinen an dieser Stelle unbedingt notwendig.

## 5.2 Das *E832*-Chromosom enthält zwei Letalmutationen, die in homozygoter Situation zu Myogenese-Störungen führen

Neben der phänotypischen Analyse des mutanten Phänotyps erfolgte bereits im Zuge von zwei Diplomarbeiten eine Defizienzen-Kartierung, um den genomischen Bereich der Mutation zu identifizieren (Reichert 2004; Wierach 2005). Im ersten Schritt wurde ein Defizienzen-Kit, bereitgestellt vom Bloomington Stock Center, zu Hilfe genommen (<http://flystocks.bio.indiana.edu>). Dabei handelt es sich um zytologisch kartierte Defizienzen, welche die jeweiligen Chromosomen zu einem hohen Prozentsatz abdecken. Durch die ungenaue Bestimmung der Defizienzen-Enden ist allerdings keine positionsgenaue Kartierung möglich. Es wurde das Defizienzen-Kit des zweiten Chromosoms angewendet und *E832*-Fliegen gegen Fliegen jeder der vorhandenen Defizienzen gekreuzt und so auf Letalmutationen getestet. Es blieben schließlich zwei Bereiche, welche keine Komplementation zeigten. Diese beiden Regionen waren mit Hilfe von molekular kartierten Defizienzen aus der Exelixis-Kollektion (<http://flystocks.bio.indiana.edu>) bis auf die beiden Bereiche 32F2 - 33A2 und 33D4 - 33E4 einzugrenzen (Reichert 2004). In der darauffolgenden Diplomarbeit konnten weitere Defizienzen genutzt werden, um schließlich die Bereiche 32F1 - 33A1 und 33E1 - 33E3 als wahrscheinliche Orte der Mutation zu identifizieren (Wierach 2005).

Die genomische Situation mit einigen ausgewählten Defizienzen ist in Abb. 15 dargestellt. Die Defizienzen Df(2L)32FP01 und Df(2L)ED775 wurden für weitere Analysen verwendet, da diese jeweils nur einen der beiden Bereiche komplett abdecken und nicht mit dem anderen Bereich überlappen. Df(2L)32FP01 ist keine molekular kartierte Defizienz und deckt daher einen nicht genau charakterisierten Bereich von 32F1-F2; 33A1-A2 ab (A. Carpenter, pers. Kommunikation). Deshalb ist eine

zielgenaue Eingrenzung hier nicht möglich. Mit Hilfe einer neuen Defizienzen-Kollektion des Bloomington Stock-Centers konnte mit der Defizienz Df(2L)BSC237 der vorderen Bereich auf 32F2-33A1 eingegrenzt. Df(2L)ED775 ist molekular charakterisiert und deletiert den Bereich von 33B8-34A3. Da es sich hier um eine recht große Defizienz mit einer großen Zahl deletierter Gene handelt, müssen die folgenden Analysen mit transheterozygoten Embryonen von *E832* mit der Defizienz durchgeführt werden, um nur die Mutation im Bereich 33 zu untersuchen. Die Defizienz Df(2L)BSC407 ist für weitere Experimente dieser Region in transheterozygoter Situation mit Df(2L)ED775 zu verwenden, um die Anzahl der deletierten Gene weiter zu reduzieren.

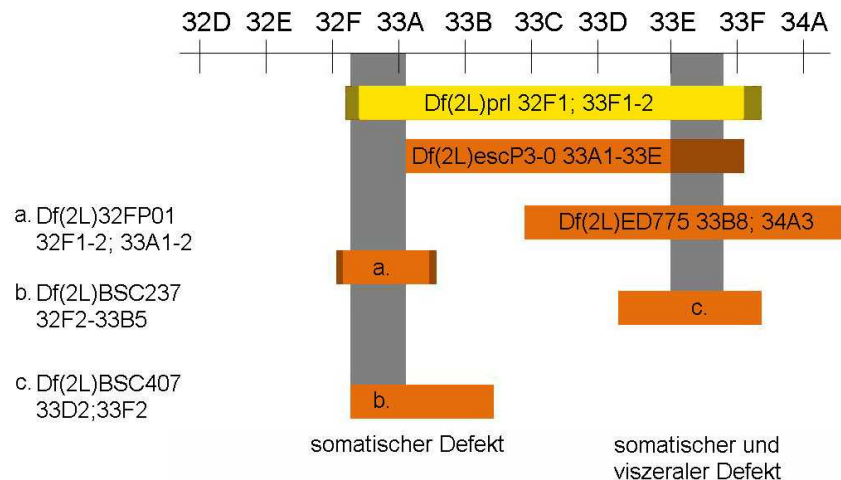


Abbildung 15: Das *E832*-Chromosom enthält zwei Bereiche mit Letalmutationen, die in homozygoter Situation zu Myogenese-Störungen führen. Gezeigt wird (nicht maßstabsgetreu) die zytologische Region von 32D bis 34A. In grau sind die beiden nicht komplementierenden Bereiche 32F2-33A1 und 33E1-33E3 dargestellt. Die hervorgehobenen Randbereiche einiger Defizienzen markieren einen nicht mittels einer zytologischen Kartierung genau definierbaren Bereich. Die bereits in den vorangegangenen Arbeiten verwendete Defizienz Df(2L)prl ist gelb markiert. Sie umfasst beide genannten Bereiche. Die im Weiteren genutzten Defizienzen sind orange hinterlegt. Df(2L)escP3-0 ist ebenfalls zytologisch kartiert und komplementiert *E832*, so dass mit Hilfe dieser Defizienz der Bereich ab 33A1 bis 33E als nicht relevant für die myogenese-relevante Mutation ist. Df(2L)32FP01 deletiert den Bereich 32F1-2 bis 33A1-2 und ist ebenfalls zytologisch kartiert. Der hier eingezeichnete kleinere Bereich konnte bereits vorher durch Exelisis-Defizienzen eingeschränkt werden (Reichert 2004). Df(2L)ED775 ist eine molekular kartierte Defizienz und deckt den Bereich 33B8-34A3 ab, so dass unter Berücksichtigung von Exelisis-Defizienzen der relevante Bereich auf 33E1-33E3 einzuschränken ist. Df(2L)BSC237 und Df(2L)BSC407 sind weitere Defizienzen, welche für weitere Experimente nutzbar sind.

Ebenso hilfreich erwies sich die Defizienz Df(2L)escP3-0, ergab sich doch hier eine Komplementation bei Kreuzung gegen das *E832*-Chromosom. Da als deletierter Bereich 33A1-33E erscheint, ist davon auszugehen, dass sich die Region zwischen den beiden genannten Bereichen nicht für die Mutation von *E832* verantwortlich zeichnet (Abb. 15).

Die Komplementationsanalysen zeigen zusammenfassend, dass auf dem *E832*-Chromosom zwei Le-

talität-hervorrufende Mutationen in recht naher Nachbarschaft auf dem linken Arm des zweiten Chromosoms lokalisiert sind. Es ist nicht zwingend, dass myogenese-spezifische Gene die Letalität verursachen, daher ist folglich notwendig, die Phänotypen von transheterozygoten Embryonen der jeweiligen Defizienzen gekreuzt mit *E832* zu analysieren.

### 5.3 Transheterozygoten-Analysen zeigen, dass Mutationen in beiden genomischen Regionen einen Myogenese-Defekt hervorrufen

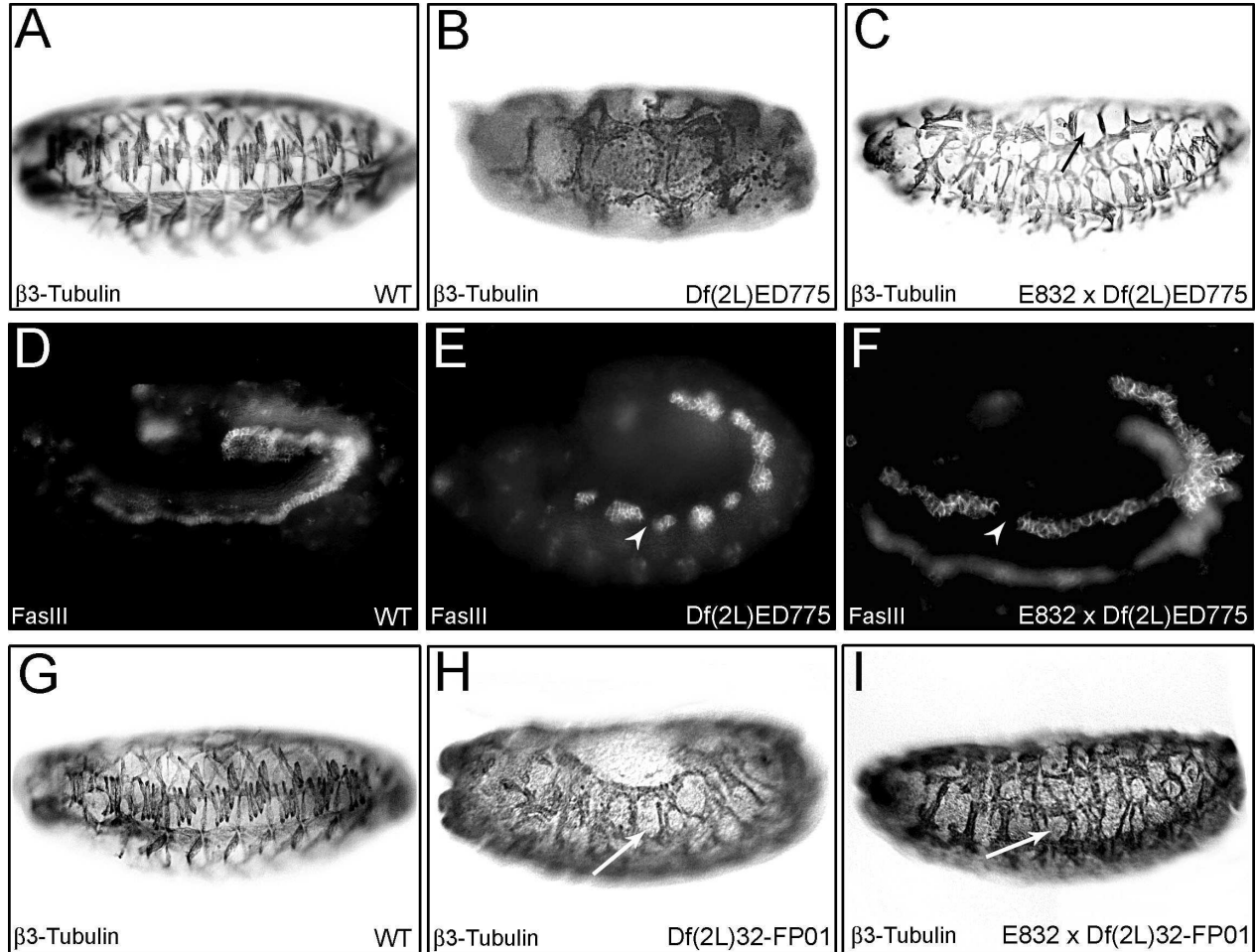
Die Komplementations-Analyse ergab zwei Bereiche des *E832*-Chromosoms, die Letal-Mutationen tragen. Dies ist nicht ungewöhnlich, da durch EMS-Mutagenese mehrere Mutationsereignisse auf einem Chromosom stattfinden können. Um eine mögliche Muskel-spezifische Mutation in einer der beiden Regionen zu identifizieren, werden  $\alpha$ - $\beta$ 3-Tubulin-Färbungen an Embryonen von *E832* in *trans* mit Embryonen der Defizienzen Df(2L)32FP01 bzw. Df(2L)ED775 durchgeführt. Zudem kann dieses Experiment Aufschluss darüber geben, ob das mutierte Gen für den somatischen und den viszeralen Myogenese-Defekt verantwortlich ist, oder ob zwei Gene mutiert sind, eines mit Relevanz im somatischen und eines mit Relevanz im viszeralen Mesoderm.

Transheterozygote Embryonen ergeben sich aus Kreuzungen von zwei Linien. Die Balancerchromosomen dieser Stämme tragen ein *lacZ*-Gen unter der Kontrolle eines distinkten Promotors und die Expression der dort kodierten  $\beta$ -Galaktosidase erlaubt somit Balancer-tragende Embryonen zu identifizieren. Folglich können Embryonen analysiert werden, die keinen Balancer mehr tragen. Hier liegen die beiden Deletions-Chromosomen *in trans* vor. Überraschenderweise zeigen sich bei beiden transheterozygoten Situationen in der Auswertung von  $\alpha$ - $\beta$ 3-Tubulin-Färbungen eine Störung der somatischen Muskulatur (Abb. 16). Zur Kontrolle werden die entsprechenden homozygoten Embryonen der Defizienz Df(2L)ED775 und Df(2L)32FP01 ebenfalls analysiert.

Nicht überraschend ist die starke Deformierung von Df(2L)ED775-Embryonen, da hier viele Gene fehlen und somit eine Auswertung bezüglich der Muskulatur erschwert wird (Abb. 16, B). Die transheterozygoten Embryonen von *E832*/Df(2L)ED775 besitzen eine fehlerhafte Anordnung der somatischen Muskulatur und es fehlen zudem Muskeln (Abb. 16, Pfeil in C). Die Muskeln sind dünner als im Wildtyp. Transheterozygote *E832*/Df(2L)ED775-Embryonen zeigen aber neben den somatischen auch einen viszeralen Defekt (Abb. 16, C und F), wobei hier der Phänotyp der homozygoten Embryonen von Df(2L)ED775 ebenfalls stärker ausgeprägt sind als in *E832*/Df(2L)ED775-Embryonen (Abb. 16, vergleiche E mit F). Erkennbar erscheinen Unterbrechungen der zirkulär viszeralen Myoblasten, wobei keine Unterscheidung von FCs und FCMs möglich erscheint (Abb. 16, E und F). Die Morphologie der Myoblasten ist, wie bereits bei homozygoten *E832*-Mutanten beobachtet, nicht wildtypisch (Abb. 16, F).

Der somatische Muskeldefekt in *E832*/Df(2L)32FP01-Embryonen ist nicht so stark ausgeprägt wie in homozygoten *E832*-Embryonen (vergleiche Abb. 11, B-F mit Abb. 16, H und I). Aber in den transheterozygoten Embryonen sind ebenfalls einige Muskeln nicht mehr vorhanden, so dass das Muskelmuster unterbrochen ist. Viele Muskeln inserieren zudem nicht an der vorgesehenen Stelle

in der Epidermis, was zu einer fehlerhaften Muskel-Struktur führt (Abb. 16, I).  $\alpha$ -FasIII-Färbungen zur Analyse des Defektes in der viszeralen Muskulatur an *E832*/Df(2L)32FP01 zeigen keine Defekte. Dies verdeutlicht, dass die in *E832* beobachteten Störungen in der viszeralen Muskulatur nicht durch eine Mutation in dem Bereich 32 F2-33A1 verursacht ist (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 16: Embryonen von *E832*/Df(2L)ED775 und *E832*/Df(2L)32FP01 zeigen Fehlentwicklungen in der Muskulatur.** Dargestellt sind die Muskel-Phänotypen von Embryonen des Wildtyps (A, D und G) der jeweiligen homozygoten Defizienz (B, E und H) neben *E832* in *trans* zu Embryonen der jeweiligen Defizienzen (C, F und I). Homozygote Df(2L)ED775-Embryonen zeigen multiple Störungen in der Entwicklung. Die somatische Muskulatur ist nur fragmentarisch ausgebildet (B).  $\alpha$ - $\beta$ 3-Tubulin-Färbungen an Transheterozygoten in den Stadien 15 bis 16 zeigen Unterbrechungen im Muskelmuster und der fehlerhaften Strukturierung der einzelnen Muskeln (Pfeil in C). Bei Betrachtung des viszeralen Mesoderms sind die Embryonen der homozygoten Defizienz in Stadium 9/10 ebenfalls stärker deformiert und zeigt vermehrt Löcher im viszeralen Band, wie dies abgeschwächt auch in *E832*/Df(2L)ED775 zu beobachten ist (Pfeilköpfe in E und F). Die Morphologie der Myoblasten erscheint nicht wildtypisch (vgl. E und F mit D). Die Defizienz Df(2L)32FP01 deletiert einen vergleichsweise kleinen Bereich und hier ist der homozygot mutante Phänotyp mit dem von *E832*/Df(2L)32FP01 in Stadium 15/16 vergleichbar (H und I), wobei in beiden Fällen die Lücken im Muskelmuster gezeigt werden können (Pfeile in H und I).



Da die Ausprägungen des mutanten Phänotyps der transheterozygoten Embryonen mit denen der homozygoten *E832*-Embryonen vergleichbar sind, trifft die Lokalisation zu, so dass davon auszugehen ist, dass mindestens zwei Letal-Mutationen auftreten, die Defekte in der Myogenese hervorrufen. In dem Bereich 32F2-33A1 ist interessanterweise ein somatischer, aber kein viszeraler Defekt und im Bereich 33E1-33E3 sowohl ein mutanter Phänotyp des somatischen und viszerale Mesoderms zu beobachten.

Aufgrund dessen wird eine Entkopplung der beiden mutierten Loci auf dem *E832*-Chromosom durchgeführt. Dabei handelt es sich um die Möglichkeit, mit Hilfe von Rekombination die beiden Mutationen voneinander zu trennen um sie so individuell zu betrachten. Durch die nahe beieinanderliegenden Regionen in 32 und 33 ist die Wahrscheinlichkeit, diese beiden Mutationen voneinander zu trennen, sehr gering, so dass eine große Anzahl von Rekombinationskreuzungen durchgeführt wurde. Aus insgesamt 350 Kreuzungen resultierten schließlich vier Linien, welche nur über eine der beiden Defizienzen letal ist. Dies ist durch Komplementations-Kreuzungen der möglichen entkoppelten Linien mit Fliegen der Mutante *E832* bzw. der beiden Defizienzen zu ermitteln. Es ergaben sich drei Linien, welche durch Df(2L)ED775 nicht komplementiert werden und die Mutationen somit im Bereich 33E1 bis 33E3 zu lokalisieren sind (Linien Nr. 42, Nr. 26, Nr. 128) und eine Linie, welche über Df(2L)32FP01 letal war (Linie Nr. 23), so dass diese Mutation in den Bereich 32F2 bis 33A1 lokalisiert ist. Diese entkoppelten Mutanten werden nun anstelle der EMS-Mutante *E832* für weitere Analysen verwendet.

#### **5.4 Die phänotypische Analyse der entkoppelten Linien zeigt überraschenderweise drei individuelle Mutationen**

Nach der Entkopplung erfolgte eine eingehende Analyse der Mutanten mit Hilfe von Antikörperfärbungen. Dabei wurde offensichtlich, dass sich die Mutanten aus der Region 33E1-33E3 voneinander unterscheiden. Die Mutanten Nr. 26 und Nr. 128 zeigen den beschriebenen Defekt im somatischen Mesoderm und das viszerale Mesoderm zeigt ähnliche Unterbrechungen wie bereits für Embryonen des *E832*-Chromosoms beschrieben (Abb. 17, C, G, K, O und S). Die Linie Nr. 128 unterscheidet sich nicht in der phänotypischen Ausprägung von Nr. 26 und wird deshalb nicht weiter verwendet. Die Mutante Nr. 42 hingegen zeigt in abgeschwächter Ausprägung eine Störung im viszerale Mesoderm, aber keine Veränderung der somatischen Muskulatur (Abb. 19, J bis O und Abb. 17, D, H, L, P und T). Die Mutante Nr. 23 aus dem Bereich 32F2-33A1 hat den gleichen Phänotyp wie *E832*/Df(2L)32FP01 (Abb. 17, B, F, J, N und R). Die genaue Beschreibung der mutanten Phänotypen erfolgt in den folgenden Kapiteln 5.4.1 und 5.4.2.

Aufgrund dieser ersten Ergebnisse ist anzunehmen, dass es sich hier nicht nur um zwei sondern um drei individuelle Mutationen auf dem *E832*-Chromosom handelt. Durch die Entkopplung ist nun die Betrachtung und Analyse der einzelnen mutanten Phänotypen getrennt voneinander möglich. Zur einfacheren Handhabung erfolgt daher eine Neubenennung der entkoppelten Mutanten: die Mutation im somatischen Mesoderm aus dem Bereich 32F2-33A1 ist folglich *32F-sm* (Linie Nr. 23, sm für somatisches Mesoderm), aufgrund ihres Phänotyps die Linien aus dem Bereich 33E1-33E3

*bubbles*<sup>33E-m</sup> (Linien Nr. 26 und 128, m für Defekte im somatischen und viszeralem Mesoderm) und *33E-vm* (Linie Nr. 42, vm für viszerale Mesoderm). Neben Antikörperfärbungen mit  $\alpha$ - $\beta$ -Tubulin und  $\alpha$ -FasIII wurden im Folgenden Nachweise mit  $\alpha$ -D-Mef2,  $\alpha$ -Lmd und  $\alpha$ -ALK durchgeführt, um die Situation der beiden Myoblastentypen zu analysieren.

#### 5.4.1 *32F-sm* und *bubbles*<sup>33E-m</sup>, aber nicht *33E-vm*, zeigen Defekte im somatischen Mesoderm

Die Analyse des somatischen Mesoderms erfolgt mittels Antikörperfärbungen mit den bereits in vorherigen Kapiteln beschriebenen  $\alpha$ - $\beta$ -Tubulin-,  $\alpha$ - $\beta$ -Galaktosidase-,  $\alpha$ -D-Mef2 sowie  $\alpha$ -Lmd-Antikörpern. Die beiden somatischen Mutanten *32F-sm* und *bubbles*<sup>33E-m</sup> ähneln sich in der Varianz des mutanten Phänotyps und auch das Fehlen der Muskeln ist offensichtlich, allerdings ist die Ausprägung des *32F-sm*-Defektes nicht so stark wie in *bubbles*<sup>33E-m</sup>-Embryonen (Abb. 17, Pfeile in B, F und C, G). Die Muskeln scheinen in *32F-sm* geordneter und die korrekte Anheftung an die Epidermis erfolgt häufiger als in *bubbles*<sup>33E-m</sup> (Abb. 17, vergleiche B und F mit C und G). Die Nachweise mit  $\alpha$ - $\beta$ -Galaktosidase und  $\alpha$ -D-Mef2 an rP298*lacZ*-tragenden Mutanten bestätigen diesen Phänotyp (Abb. 17, J und N bzw. K und O). Feststellbar war gleichfalls eine Reduktion der Anzahl rP298*lacZ*-positiver Kerne in den gezeigten Stadien. Da in *32F-sm* weniger Kerne fehlen, scheint es, dass die Ausprägung des mutanten Phänotyps von *32F-sm*-Embryonen schwächer ist als in *bubbles*<sup>33E-m</sup>-Embryonen (Abb. 17, J, N und K, O).

Wie auch schon in der Ausgangslinie *E832* gezeigt, kann mit  $\alpha$ -Lmd eine wildtypische Verteilung des Proteins im somatischen Mesoderm von *32F-sm*- und *bubbles*<sup>33E-m</sup>-Mutanten beobachten werden (Abb. 17, R und S). Es fällt aber ebenfalls auf, dass das viszerale Mesoderm in etwas *bubbles*<sup>33E-m</sup>-Mutanten dünner und unstrukturierter als im Wildtyp erscheint (Abb. 17, Pfeilkopf in S).

Um sicher zu gehen, dass es sich wirklich um die drei voneinander getrennten Mutationen handelt, wurden die entkoppelten mutanten Embryonen in *trans* mit *E832* bzw. den genannten Defizienzen analysiert. Hier bestätigten sich die bereits beschriebenen mutanten Phänotypen in der somatischen Myogenese in der jeweiligen transheterozygoten Situation (Abb. 18). Als Kontrolle wurden Embryonen von *32F-sm*/Df(2L)ED775 und *bubbles*<sup>33E-m</sup>/Df(2L)32FP01 analysiert und erwartungsgemäß zeigten die Embryonen ein wildtypisches Muskelmuster (Abb. 18, E und I). Die beschriebenen Mutationen sind deshalb in die in Kapitel 5.2 lokalisierten Bereiche einzuordnen und die entkoppelten Linien so für weitere Analysen bezüglich der Identifikation der betroffenen Gene nutzbar.

Ein unerwartetes Ergebnis zeigt die Analyse der Antikörperfärbungen von *33E-vm*, da hier kein Defekt im somatischen Mesoderm zu identifizieren ist (Abb. 17, dritte Spalte). Hier soll ein besonderes Augenmerk auf das viszerale Mesoderm gelegt werden, da  $\alpha$ -Lmd-Färbungen Hinweise zeigen, dass das viszerale Band Unterbrechungen aufweist wie sie schon in *E832*-Mutanten beschrieben (Abb. 17, Pfeilköpfe in T). Die somatische Muskulatur der Embryonen von *33E-vm*/Df(2L)ED775 ist wildtypisch (Abb. 18, C).

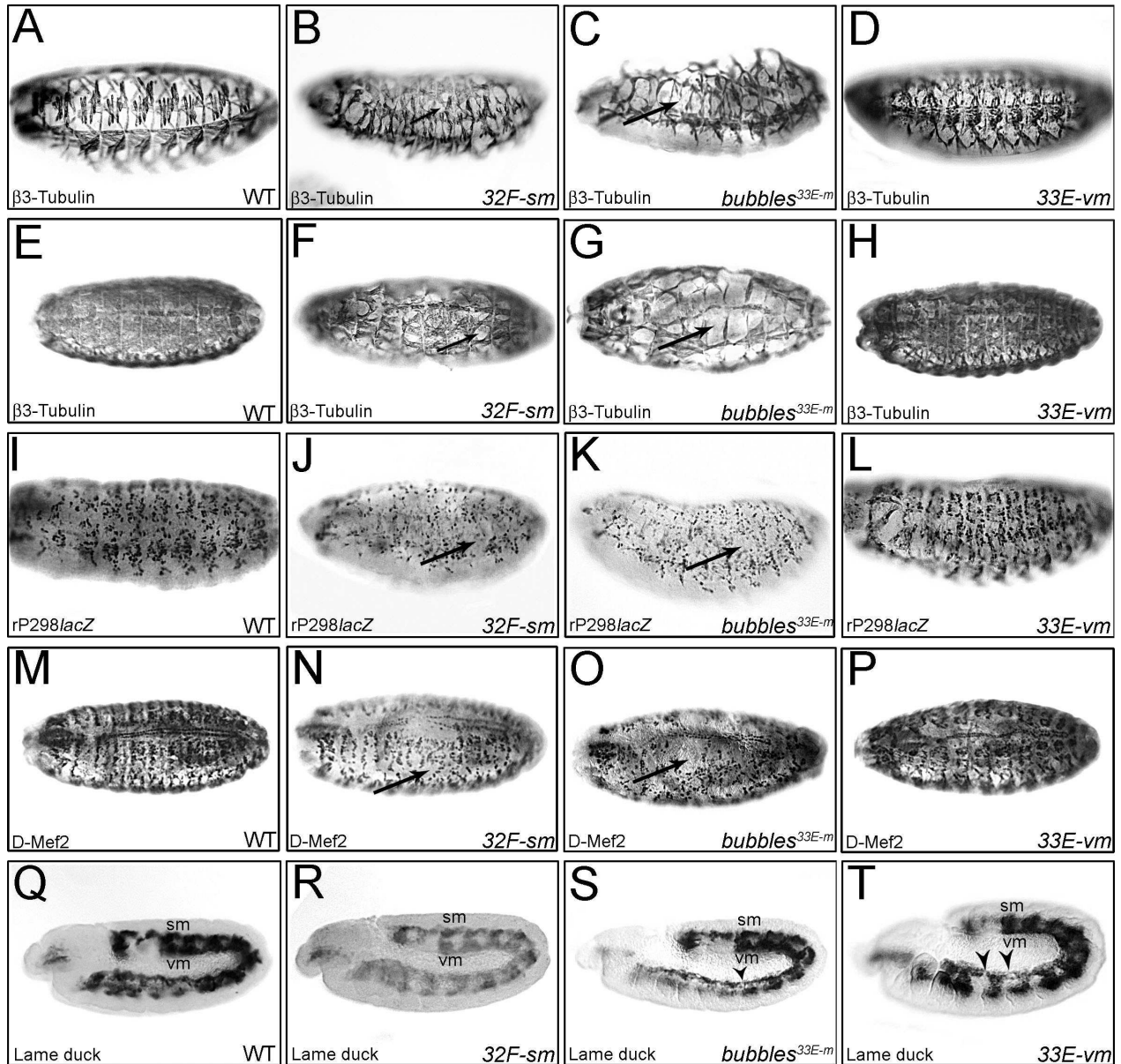


Abbildung 17: *32F-sm* und *bubbles*<sup>33E-m</sup> zeigen einen somatischen Muskel-Phänotyp.  $\alpha$ - $\beta$ -Tubulin-Nachweise zeigen Fehlentwicklungen in der somatischen Muskulatur von *32F-sm*- (B und F) und *bubbles*<sup>33E-m</sup>-Mutanten (C und G) im Stadium 15/16. Die Muskulatur in den *bubbles*<sup>33E-m</sup>-Embryonen (C und G) ist deutlich unregelmäßiger als in *32F-sm*-Embryonen (B und F). Die Pfeile markieren die Unterbrechungen des somatischen Muskel-Musters. Es sind deutlich die unstrukturierten Muskeln erkennbar. In *33E-vm*-Mutanten sind keine Defekte in der somatischen Muskulatur zu beobachten (D und H). Nachweise von  $\alpha$ - $\beta$ -Galaktosidase an rP298lacZ-markierten Mutanten zeigen, dass in den späten Stadien 15 bis 16 weniger rP298lacZ-positive Kerne vorhanden sind als im Wildtyp (I im Vergleich zu J bis L).  $\alpha$ -D-Mef2-Färbungen bestätigen diesen Defekt im Stadium 15/16 durch eine verringerte Anzahl von D-Mef2-positiven Kernen (M im Vergleich zu N bis P).  $\alpha$ -Lmd-Färbungen zeigen, dass in *32F-sm* die FCMs im somatischen und viszeralem Mesoderm in Stadium 9/10 normal erscheinen (R), während *33E-vm* deutliche Unterbrechungen im viszeralem Mesoderm hat (Pfeilköpfe in T). In *33E-vm*-Embryonen sind die somatischen FCMs normal ausgebildet. In den mutanten Embryonen von *bubbles*<sup>33E-m</sup> ist das viszerale Band dünner und unstrukturierter (S, im Vergleich mit T). Hier wirken die somatischen FCMs normal ausgebildet (S).

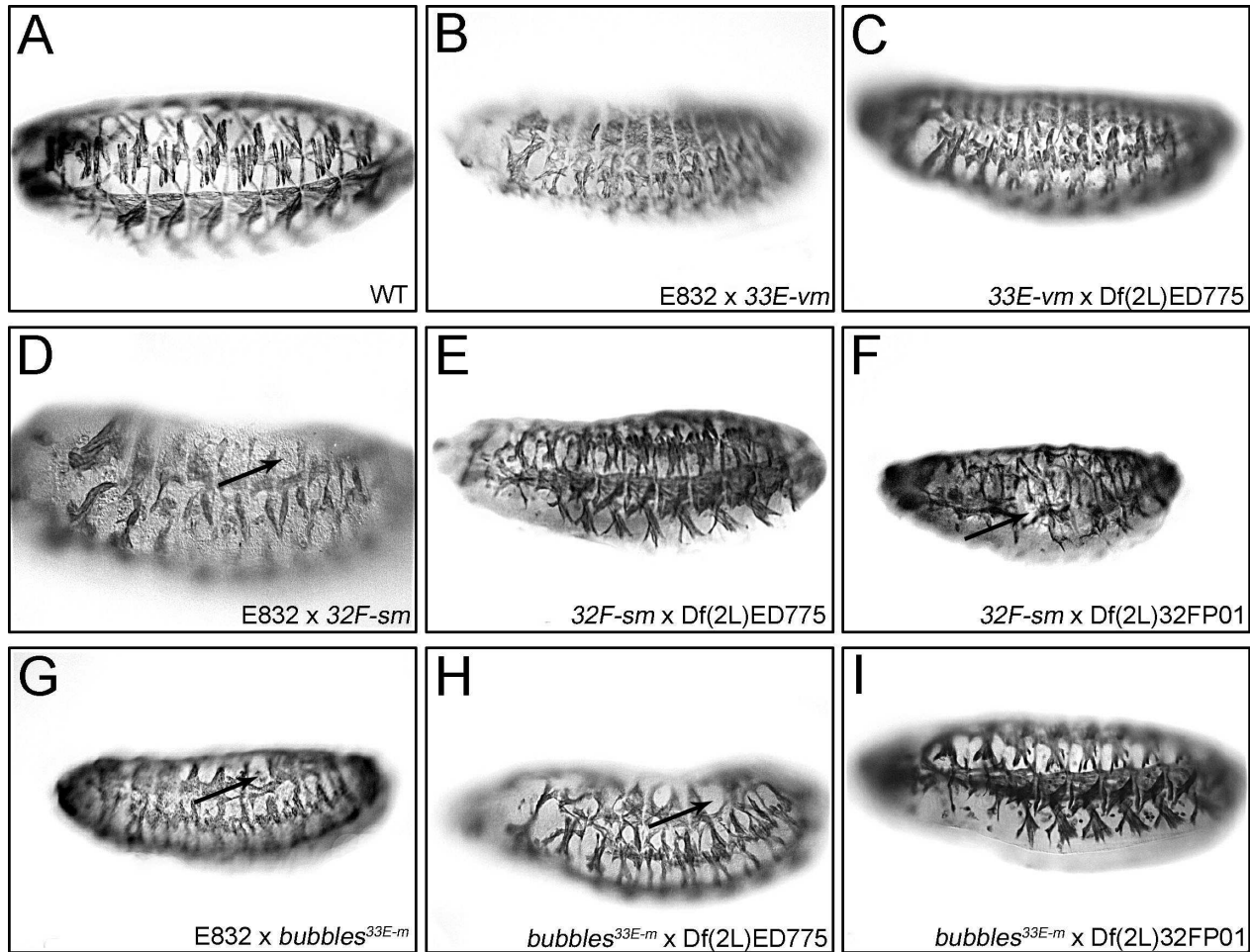


Abbildung 18: Die Phänotypen der homozygoten Mutanten ähneln in Stadium 15/16 denen der Transheterozygoten der Mutanten mit den jeweiligen Defizienzen bzw. mit *E832*. Die Mutante *33E-vm* ist auch in *trans* mit *E832* (B) und *Df(2L)ED775* (C) hinsichtlich der somatischen Muskulatur mit  $\alpha$ - $\beta$ -Tubulin-Färbungen nicht vom Wildtyp zu unterscheiden (A). Die Embryonen von *32F-sm* in *trans* mit *Df(2L)32FP01* (F) und *E832* (D) sind anhand der Unterbrechungen im Muskelmuster und einer fehlerhaften Struktur der Muskelfasern miteinander vergleichbar (Pfeile in D und F). In *32F-sm/Df(2L)ED775* sind keine Defekte zu erkennen (E). *bubbles*<sup>33E-m</sup>-Embryonen zeigen eine gestörte Entwicklung der somatischen Muskulatur in transheterozygoter Situation mit *E832* (G) und *Df(2L)ED775* (H), aber nicht mit *Df(2L)32FP01* (I). Die Lücken im Muskelmuster sind in G und H durch Pfeile markiert.

Hier stellt sich die Frage, in welche Beziehung die Mutationen in *33E-vm* und *bubbles*<sup>33E-m</sup> zueinander zu setzen sind, da sie in den gleichen genomischen Bereich kartiert wurden und eine Komplementations-Analyse überraschenderweise zeigte, dass diese beiden Linien sich nicht komplementieren können.  $\alpha$ - $\beta$ -Tubulin-Antikörperfärbungen an *bubbles*<sup>33E-m</sup>/*33E-vm* zeigen allerdings keine Defekte im somatischen Mesoderm (Daten nicht gezeigt), was darauf hindeutet, dass sich ein zusätzlicher, bisher nicht identifizierter und nicht myogenese-relevanter Letalitätsfaktor auf dem Chromosom befinden könnte.

#### 5.4.2 Der viszerale Phänotyp ist in den entkoppelten Mutanten *33E-vm* und *bubbles*<sup>33E-m</sup> nicht mehr so deutlich manifestiert wie in *E832*

Aufgrund der Ergebnisse bezüglich der EMS-Mutante *E832* und der vorangegangenen  $\alpha$ -Lmd-Färbungen wurde an den entkoppelten Linien eine Analyse der Entwicklung der viszeralen Muskulatur durchgeführt. Ein besonderes Augenmerk lag mit Doppelfärbungen von  $\alpha$ -FasIII mit  $\alpha$ - $\beta$ -Galaktosidase und  $\alpha$ -Anaplastic-Lymphoma-Kinase (ALK) auf der Morphologie der FCs und FCMs sowie der Bildung der Darm-Konstriktionen.

Die viszerale Muskulatur ist in allen drei Mutanten vorhanden. *32F-sm* zeigt keine Störung des viszeralen Mesoderms (Abb. 19, D bis F und Abb. 20, E). Hier sind die viszeralen FCs und FCMs gut voneinander zu unterscheiden (Abb. 19, Kreis in D). In *bubbles*<sup>33E-m</sup>-Mutanten ist ebenfalls eine Unterscheidung der Myoblasten möglich (Abb. 19, G bis I, siehe auch Kreis in G). Die Morphologie der Zellen ist in den Stadien 10 bis 14 wildtypisch (Daten nicht gezeigt), obwohl einige Embryonen Unterbrechungen in den viszeralen Band in Stadium 9/10 zeigen (Abb. 17, Pfeilkopf in S).

Es wurde bereits gezeigt, dass das viszeral-mesodermale Band in Stadium 9/10 in *33E-vm*-Mutanten unterbrochen ist (Abb. 17, Pfeilkopf in T). Die Zelltypen sind aber größtenteils zu erkennen (Abb. 19, Kreis in J und M). Zusätzlich scheinen in diesen Mutanten in frühen Embryonen, kurz nachdem sich die viszeralen Cluster ausbilden, sehr viele *rp298lacZ*-positive Zellen vorhanden zu sein, welche breiter gestreut im Embryo vorliegen (Abb. 19, J und L). In einer großen Anzahl der Embryonen ist daher ein ähnlicher viszeraler Defekt zu beobachten, wie dies in den Embryonen der Ausgangslinie *E832* bereits beschrieben wurde, allerdings in *33E-vm*-Mutanten nicht so stark ausgeprägt. In einigen Embryonen scheint die Determination der viszeralen Myoblasten nicht fehlerhaft zu sein, da die Myoblastentypen größtenteils noch erkennbar sind (siehe dazu Abb. 13 und Abb. 14 im Vergleich mit 19, J bis O). In *33E-vm* ist deutlich eine Muskulatur zu erkennen, welche den Darm umschließt, was den Umkehrschluss zulässt, dass in *33E-vm* FCMs gebildet werden müssen (Abb. 20, D). Es sind aber keine Unterbrechungen der viszeralen Muskulatur zu sehen, wie dies in *E832*-Mutanten der Fall war (Abb. 20, vergleiche B mit C und D).

Neben diesem Defekt zeigen *33E-vm*- und *bubbles*<sup>33E-m</sup>-Embryonen die bereits in *E832*-Mutanten beschriebenen Verzögerung oder Unvollständigkeit in der Bildung der Konstriktionen (Abb. 20, B bis D). In *bubbles*<sup>33E-m</sup>-Mutanten sind in einigen Embryonen noch Ansätze zur Bildung der Konstriktionen zu erkennen (Abb. 20, Sternchen in C). Der Darm von *32F-sm* hingegen ist wildtypisch ausgebildet (Abb. 20, Sternchen in E). Die hier beschriebenen Phänotypen wurden auch in den jeweiligen transheterozygoten Kreuzungen der Mutanten mit der in Abb. 18 verwendeten Defizienzen beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Die Rezeptor-Tyrosin-Kinase (RTK) ALK ist in den Vorläuferzellen des viszeralen Mesoderms exprimiert (siehe Einleitung Kapitel 2.4, Abb. 3, Stute *et al.* 2004).  $\alpha$ -Alk-Färbungen an *bubbles*<sup>33E-m</sup>-Mutanten zeigen in Stadium 9 eine vergleichbare Verteilung von Alk wie der Wildtyp im Stadium 10 (Abb. 21, vergleiche A bis C mit D bis F).

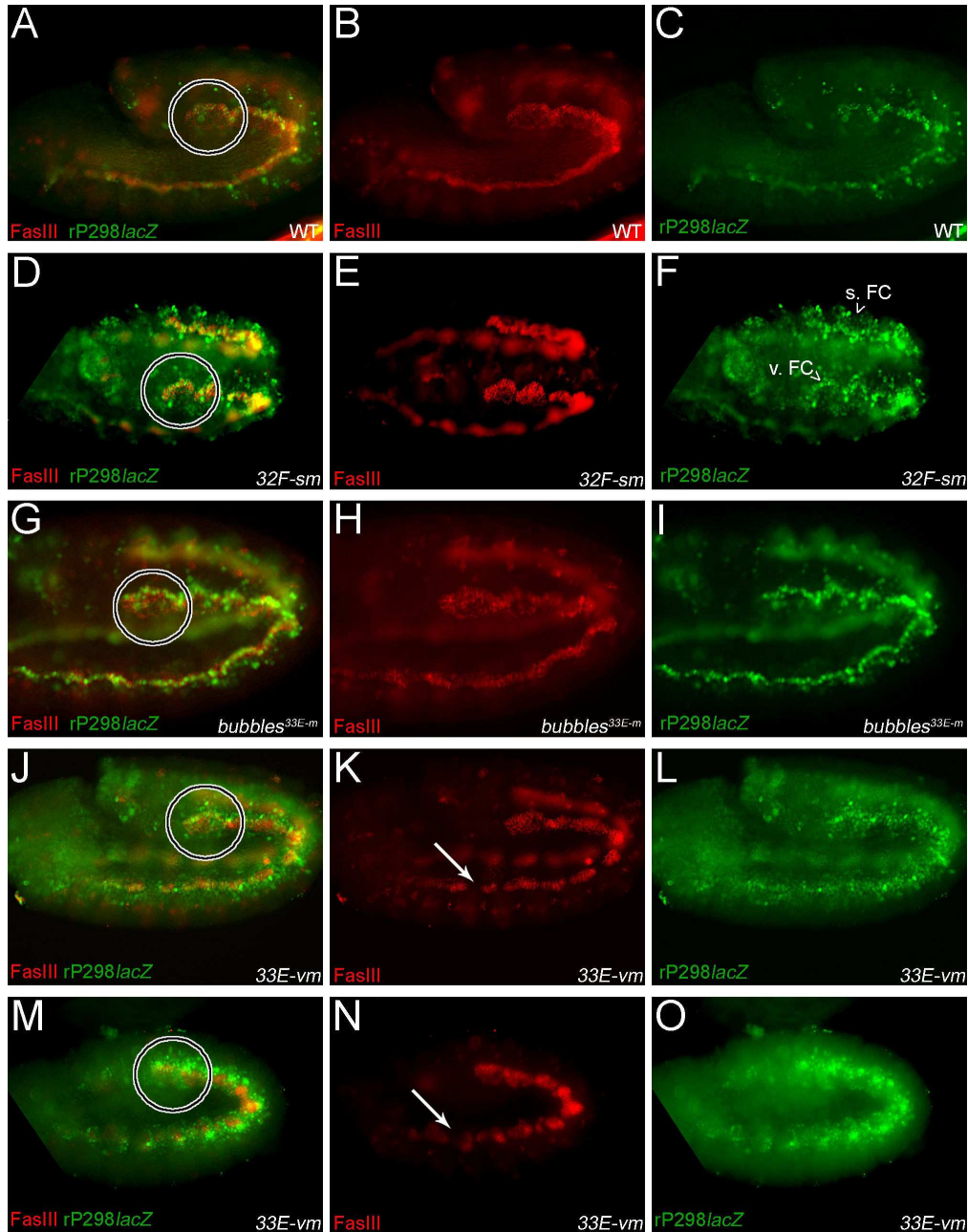


Abbildung 19: **Das viszerale Mesoderm ist nur in *33E-vm* sichtbar verändert.** Hier werden die Stadien 9 bis 10 von *32F-sm*, *bubbles*<sup>33E-m</sup> und *33E-vm*, mit dem 'Enhancer-Trap' *rP298lacZ* als FC-Marker, in Bezug auf die Anwesenheit der beiden Myoblastentypen in FasIII (grün)- und  $\alpha$ - $\beta$ -Galaktosidase (rot)-Antikörperfärbungen verglichen. Im Wildtyp sind die FCs durch  $\beta$ -Galaktosidase-Expression von den FCMs ohne *rP298lacZ* zu unterscheiden (A bis C und Kreis in A). In *32F-sm*-Mutanten ist keine Veränderung der Myoblasten-Anordnung zu in viszeralem Mesoderm zu beobachten (D bis F, und Kreis in D). Dieser Embryo ist etwas älter als der Wildtyp und die somatischen FCs (s. FC) sind neben den viszeralen FCs (v. FC) schon zu erkennen (F). In den Mutanten von *bubbles*<sup>33E-m</sup> ist ebenfalls gut die Reihe mit den FCs und die darunter positionierten FCMs zu erkennen (G bis I und Kreis in G). Eine andere Situation zeigt sich in *33E-vm*-Mutanten (J bis O). Hier sind die Unterbrechungen des viszeralen Bandes zu beobachten (J bis O, besonders Pfeil in K und N und Kreis in J und M). Allerdings finden sich außerhalb der FC-Anordnung *rP298lacZ*-positive Zellen, was darauf hindeutet, dass zu viele FCs vorhanden ist (J und L bzw. M und O im Vergleich zu A und C).

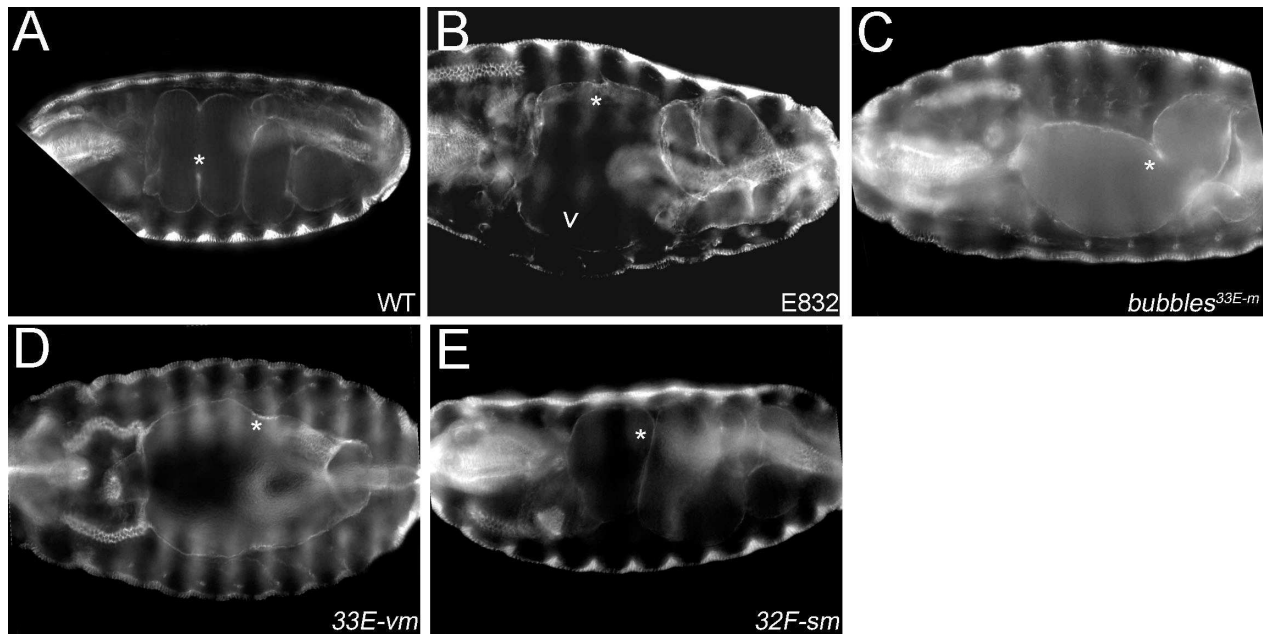


Abbildung 20: **Die Konstriktionen werden in mutanten Embryonen von *bubbles*<sup>33E-m</sup> und *33E-vm* teilweise nicht korrekt gebildet.** Im Vergleich mit Wildtyp-Embryonen (A) verläuft in den Mutanten in Stadium 16 bis auf *32F-sm* die Bildung der Darm-Konstriktionen (mit Sternchen markiert) nur unvollständig oder verzögert (B bis D im Vergleich zu E). In den Embryonen der EMS-Linie *E832* kann teilweise ein Verlust der FasIII-Expression beobachtet werden (Pfeilkopf in B), was in *bubbles*<sup>33E-m</sup>- und *33E-vm*-Mutanten nicht der Fall war (C und D). In einigen Fällen sind Konstriktionen leicht angedeutet, aber meist nur von einer Seite und nicht symmetrisch wie im Wildtyp (vgl. Sternchen in B bis C mit A).

In den darauffolgenden Stadien ist ebenfalls keine Veränderung der Alk-Expression in *bubbles*<sup>33E-m</sup>-Mutanten zum Wildtyp zu erkennen (Daten nicht gezeigt). Dies unterstützt die Annahme, dass die Myoblasten in *bubbles*<sup>33E-m</sup>-Mutanten normal determiniert werden. Eine etwas andere Verteilung ist in Embryonen der *33E-vm*-Mutanten zu beobachten (Abb. 21, G bis K). In Doppelfärbungen von  $\alpha$ -Alk und  $\alpha$ - $\beta$ -Galaktosidase an rP298*lacZ*-markierten *33E-vm*-Mutanten findet sich in frühen Embryonen in Stadium 9 eine normale Verteilung von Alk, wobei hier, wie bereits oben in Abb. 19 gezeigt, eine erhöhte Anzahl von rP298*lacZ*-positiven Zellen zu sehen ist (Abb. 21, G bis I). In den späteren Stadien, wenn sich das viszerale Band bereits geschlossen hat, ist an einigen Stellen eine Unterbrechung zu beobachten (Abb. 21, vergleiche J mit Pfeil in K).

Der viszerale Phänotyp in 33E1-33E3 scheint durch die Entkopplung abgeschwächt worden zu sein, so dass es schwierig wird, hier weitere Analysen durchzuführen. Einige Embryonen von *33E-vm* zeigen ein relativ normales Muster der viszerale FCs und FCMs (Daten nicht gezeigt), weshalb der bereits in *E832*-Embryonen beschriebene Phänotyp in Stadium 9/10, nicht immer beobachtet werden kann. Daher wird hier auf weitere Experimente verzichtet und der Hauptaugenmerk auf die Suche des mutierten Gens in *bubbles*<sup>33E-m</sup> gelegt, um Einblicke in die Bedeutung dieses Gens für die somatische Myogenese zu gewinnen.



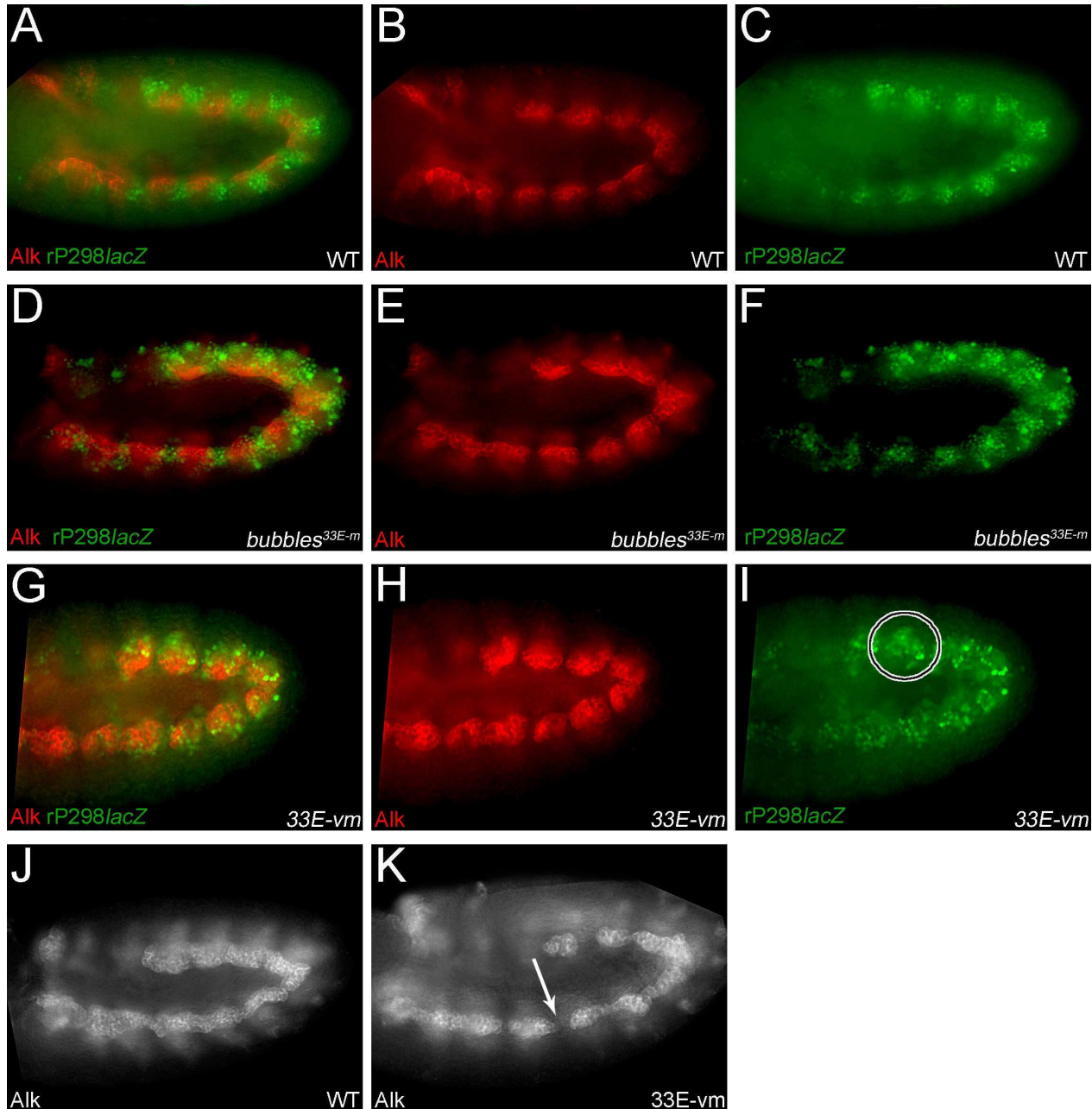


Abbildung 21: **Alk ist in *bubbles*<sup>33E-m</sup>- Mutanten normal exprimiert, während in *33E-vm*-Mutanten eine vermehrte Expression von Alk vorliegt.** Im Wildtyp ist Alk (rot) in Stadium 9 in deutlich abgetrennten Zell-'Clustern' exprimiert. rP298lacZ-positive Zellkerne befinden sich hier in der außen liegenden Zellschicht (A bis C) und markieren die FCs. Die hier zwischen den Zellhaufen lokalisierten rP298lacZ-positiven (grün) Zellen befinden sich in der Ebene des somatischen Mesoderms. Diese Verteilung von Alk ist ebenfalls in *bubbles*<sup>33E-m</sup> zu beobachten (D bis F). Der hier gezeigte Embryo befindet sich schon in Stadium 10 und die 'Cluster' beginnen bereits, sich zu schließen (D bis F). In *33E-vm* ist Alk in Stadium 9 zwar normal verteilt, aber es ist eine erhöhte Anzahl von rP298lacZ-positiven Zellen zu beobachten (G bis I, besonders Kreis in I). In Stadium 10 schließt sich das viszerale Band nicht korrekt und Unterbrechungen sind zu erkennen (vergleiche Wildtyp in J mit *33E-vm* in K, Pfeil)



### 5.4.3 Die Mutante *bubbles*<sup>33E-m</sup> zeigt eine verringerte Anzahl somatischer rP298lacZ-positiver Zellkerne in Stadium 16

Die  $\alpha$ - $\beta$ -Galaktosidase-Nachweise an mit rP298lacZ- markierten *bubbles*<sup>33E-m</sup>-Mutanten zeigten eine mögliche Reduktion der rP298lacZ-positiven FCs (Abb. 17, K). Dies soll im folgenden Abschnitt näher betrachtet werden.

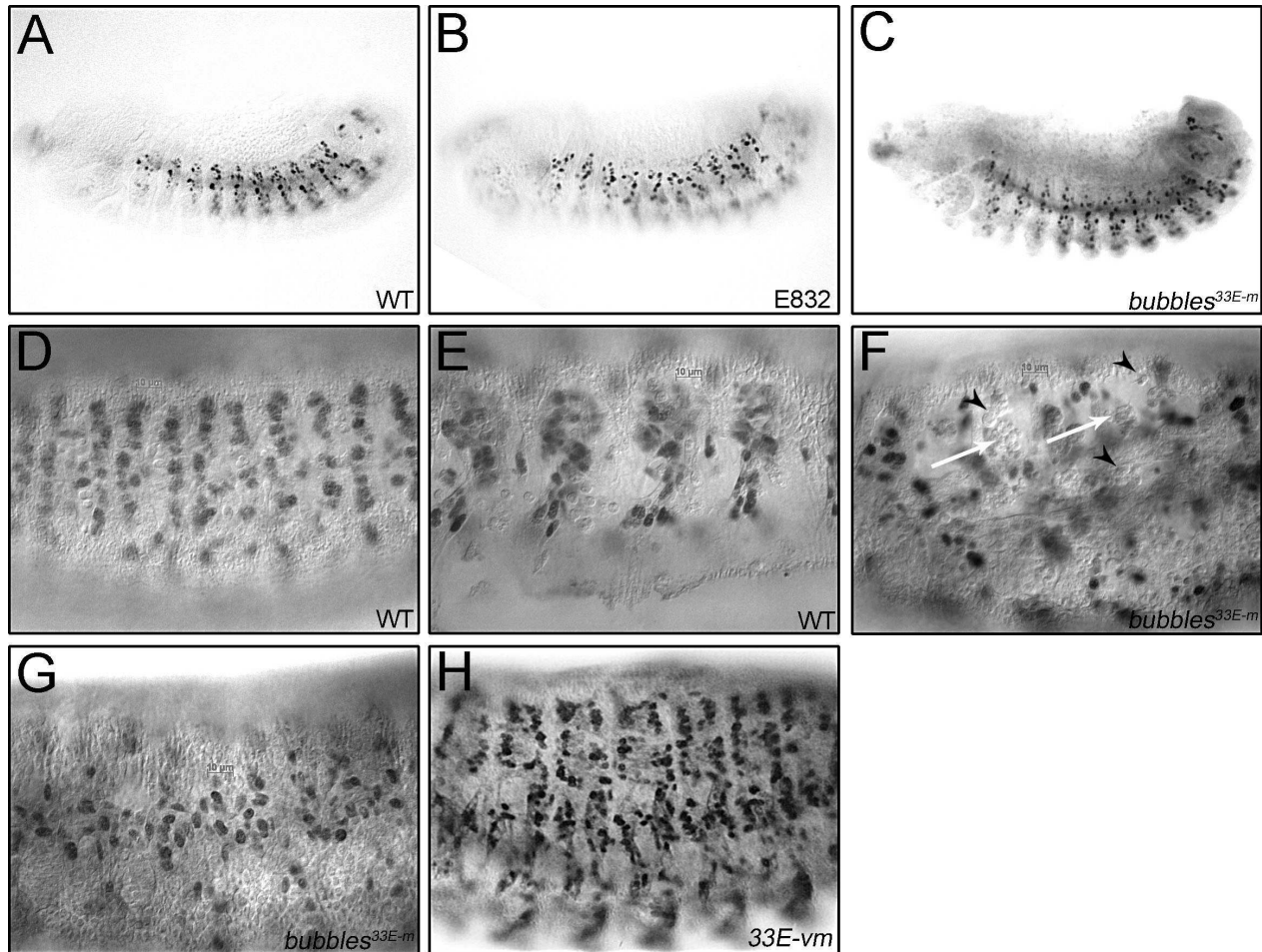


Abbildung 22: Die Anzahl der rP298lacZ-positiven Kerne ist in Stadium 16 in *bubbles*<sup>33E-m</sup>-Embryonen deutlich reduziert. Im Wildtyp sind in Stadium 12/13 die FCs, markiert mit rP298lacZ in den Segmenten geordnet (A). Dieses ist auch in *E832*- und *bubbles*<sup>33E-m</sup>-Mutanten zu beobachten (B und C), obwohl *E832*-Mutanten auch Bereiche ohne FCs zeigten (Pfeil in B). Ab Stadium 16 ist die Anordnung der rP298lacZ-positiven Kerne gut zu erkennen (D und E). In *bubbles*<sup>33E-m</sup>-Mutanten erscheint die Struktur der Muskulatur ungeordnet, die Anzahl der rP298lacZ-positiven Kerne ist reduziert (F und G). In F sind außerdem Zellen zu erkennen, welche der Morphologie nach Makrophagen sind (weiße Pfeile). Ebenso erscheinen Zellen, welche keine rP298lacZ-Expression zeigen. Ihrer Morphologie nach handelt es sich um FCMs (Pfeilköpfe in F). Die Embryonen der Mutante *33E-vm* zeigen keine Veränderung im Vergleich zum Wildtyp (H).

Ein Auszählen der Kerne ist aufgrund der Plastizität des Embryos nicht erfolgsversprechend, aber trotzdem besteht die Möglichkeit, die Reduktion der Anzahl der FCs zu veranschaulichen (Abb. 22).

Die Zellkerne befinden sich im Wildtyp in Stadium 16 an den gleichen Positionen je Hemisegment und sind somit eindeutig identifizierbar (Abb. 22, D und E). In diesem Stadium fusionierten die FCMs bereits größtenteils mit den FCs und ihre Kerne nehmen daher nach der Fusion die gleichen Eigenschaften an und exprimieren auch  $\beta$ -Galaktosidase, was deutlich am Anstieg der Anzahl von *lacZ*-positiven Zellen von Stadium 13/14 bis Stadium 16 zu sehen ist (Abb. 22, vergleiche A mit D und E). *bubbles*<sup>33E-m</sup>-Embryonen unterscheiden sich in Stadium 13/14 nicht eindeutig vom Wildtyp, was darauf hindeutet, dass die FCs normal determiniert werden (Abb. 22, vergleiche A mit C). Nach den fusionsrelevanten Stadien ist aber die Anzahl der rP298*lacZ*-positiven Kerne nicht wildtypisch (22, F und G). Die Identifizierung spezifischer Kerne ist in *bubbles*<sup>33E-m</sup>-Mutanten ebenfalls nicht möglich, da die wenigen *lacZ*-positiven Zellkerne ungeordnet erscheinen (Abb. 22, vergleiche E mit F und G).

Zum Vergleich ist in Abb. 22 die EMS-Mutante *E832* aufgeführt (vergleiche Kapitel 5.1, Abb. 12, G bis I und Abb. 22, B). Hier sehen die Embryonen der Stadien in Stadium 12/13 wildtypisch aus, obwohl an einigen Stellen ein Bereich ohne FCs zu erkennen ist (Abb. 22, Pfeil in B). Es kann sich hierbei aber um eine Varianz der normalen Ausprägung handeln. Die Embryonen von *33E-vm* zeigen keine Veränderung in der Anzahl der FCs in Stadium 12/13 gegenüber dem Wildtyp (22, H).

Mit diesen Nachweisen konnte ein weiteres Merkmal beobachtet werden. In Abb. 22 sind Zellen zu sehen, wie sie im Wildtyp nicht zu beobachten sind (Sternchen, Pfeilkopf und Pfeile in F). Die Identität dieser Zellen ist nicht eindeutig bestimmbar, aber da sie eine ähnliche Morphologie wie FCMs haben, könnte es sich hier um diesen Zelltyp handeln (Pfeilkopf in F). Die größeren Zellen scheinen der morphologie nach Makrophagen zu sein (Pfeile in F), welche normalerweise FCMs und andere nicht benötigte Zellen entfernen, falls keine Fusion stattfindet. Diese Merkmale der Mutante werden im Kapitel 5.4.4 näher untersucht.

#### **5.4.4 In *bubbles*<sup>33E-m</sup>-Embryonen sind viele $\beta$ 3-Tubulin-negative, unfusionierte Myoblasten und eine erhöhte Anzahl von Makrophagen zu beobachten**

Eine genauere Betrachtung von  $\alpha$ - $\beta$ 3-Tubulin- und  $\alpha$ - $\beta$ -Galaktosidase-Färbungen an *bubbles*<sup>33E-m</sup>-Mutanten zeigte eine Besonderheit in der Ausprägung des somatischen Muskel-Phänotyps (siehe Abschnitt 5.4.3). In Abb. 22 konnte beobachtet werden, dass einige Zellen nicht rP298*lacZ*-positiv sind und diese auch kein  $\beta$ 3-Tubulin exprimieren (Abb. 23). In der Nomarski-Optik des Lichtmikroskopes ist gut zu sehen, dass es sich hierbei um Zellen handelt, welche sich in den Bereichen der FCMs befinden und auch eine ähnliche tropfenförmige Morphologie aufweisen, weshalb zur Vermutung steht, dass es sich hierbei um FCMs handeln könnte (Abb. 23, E). Neben diesen Zellen sind sehr große Zellen zu erkennen (Abb. 23, Pfeilköpfe in D bis F). Dabei handelt es sich wahrscheinlich um Makrophagen, welche die nicht fusionierten FCMs entfernen (Abb. 23, Pfeilköpfe in D bis F). Im Wildtyp sind normalerweise mehr FCMs vorhanden als schließlich zur Fusion benötigt, und der Überschuss wird zum Ende der Embryogenese von Makrophagen verdaut.

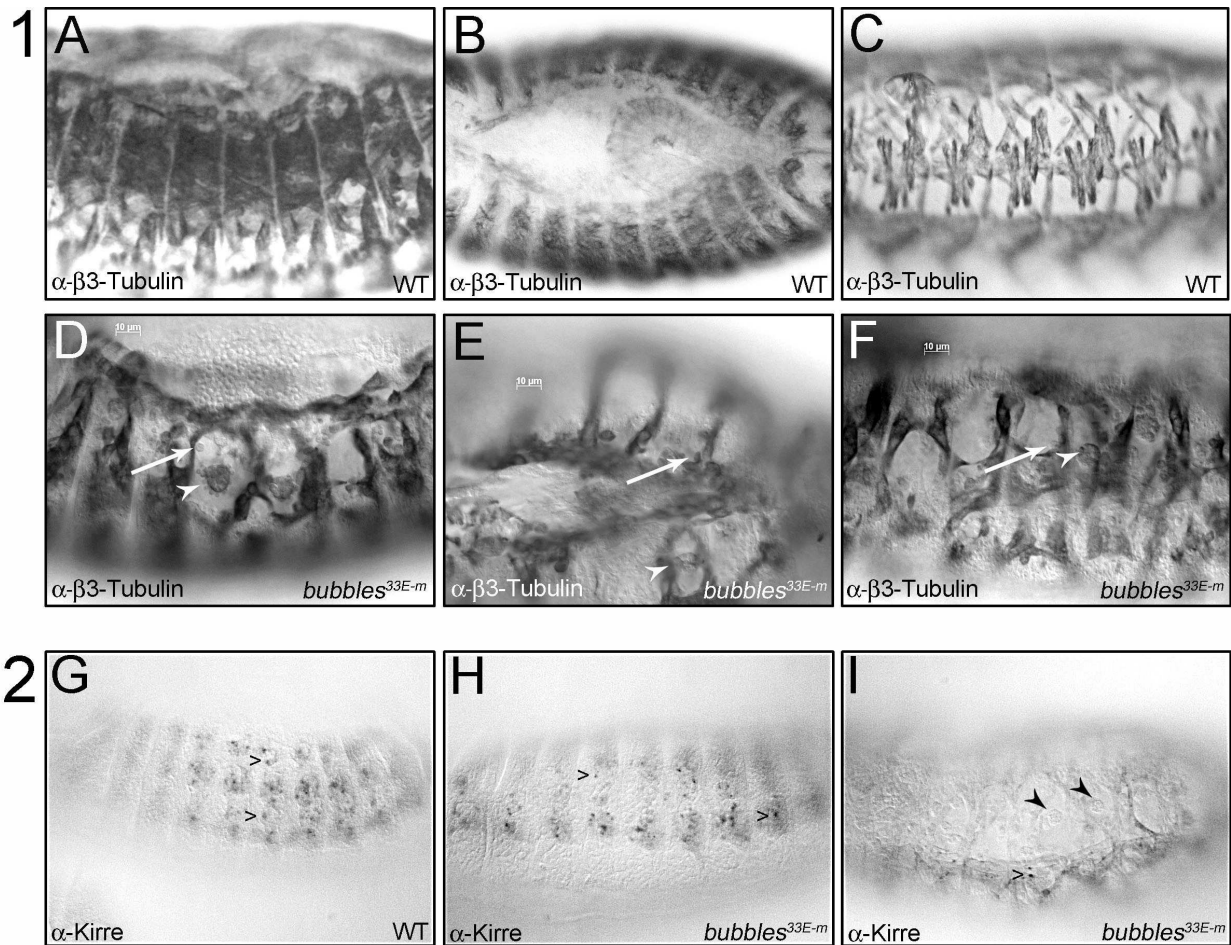


Abbildung 23: In *bubbles<sup>33E-m</sup>*-Mutanten sind in Stadium 14 vermehrt Makrophagen und nicht fusionierende FCMs vorhanden, aber sie zeigen eine korrekte Adhäsion zwischen FCM und wachsenden Myotuben. (1) Es ist in *bubbles<sup>33E-m</sup>*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp zu erkennen, dass in Stadium 14 in den Bereichen fehlender Muskelfasern vermehrt Makrophagen (Pfeilköpfe) vorhanden sind (vgl. A mit D, bzw. C mit F). An einigen Stellen sind Zellen zu beobachten, die ihrer Morphologie nach FCMs sind (Pfeilköpfe in D bis E), aber nur sehr schwach bis kein  $\beta$ -Tubulin exprimieren. (2) Färbungen mit  $\alpha$ -Kirre (G bis I) zeigen an, dass die Myoblasten in Stadium 13/14 in *bubbles<sup>33E-m</sup>*-Mutanten in der Lage sind, miteinander Kontaktstrukturen zu etablieren und FuRMAS (dünne Pfeile jeweils in G bis I) zu bilden. Hier kann aber nicht ausgewertet werden, ob es sich um eine geringere Anzahl an FuRMAS handelt. Auch in Stadium 15 finden vereinzelt Fusionen statt (I), wobei auch hier die Makrophagen deutlich zu erkennen sind (Pfeilköpfe in I).

In *bubbles<sup>33E-m</sup>*-Mutanten ist das Erscheinen von Makrophagen vergleichsweise früh ab Stadium 14/15 zu beobachten (Abb. 23, Pfeilköpfe in D bis F). Dies zieht die Hypothese nach sich, dass es ein Problem während der Myoblastenfusion gibt, und dass die nicht fusionierenden Zellen entfernt werden. Wie in Abb. 23, D zu erkennen ist, sind die FCMs durchaus in der Lage, an die FCs zu binden, was sich in der Fähigkeit der FCMs zur Ausbildung von Filopodien widerspiegelt (Abb. 23, Pfeile in D bis F). Diese Zellen scheinen aber nicht mehr die folgenden Fusionsschritte durchzuführen. Eine

Färbung mit  $\alpha$ -Kirre zeigt, dass die FCs bzw. die wachsenden Myotuben und FCMs zur Adhäsion fähig sind, da FuRMAS identifizierbar sind (Abb. 23, dünne Pfeilköpfe in H und I). Es kann zur Zeit nicht bestimmt werden, ob es sich um eine geringere Anzahl von FuRMAS handelt, weshalb dies noch besonders zu analysieren ist. Auch in Stadium 15 ist vereinzelt noch eine Duf/Kirre-Expression zu beobachten (Abb. 23, dünner Pfeilkopf in I), wobei hier die Makrophagen wieder besonders hervorzuheben sind (Abb. 23, Pfeilköpfe in I).

## 5.5 In den beiden genomischen Bereichen, in denen die Mutationen von *E832* lokalisieren, liegen viele uncharakterisierte Gene

Es folgt die Analyse der Gene in den kartierten genomischen Bereichen 32F2-33A1 und 33E1-33E3. In erster Linie werden dazu Datenbanken herangezogen, um eventuell vorhandene cDNAs der ausgewählten Gene für *in situ*-Hybridisierungen zur Analyse der Expressionsmuster zu verwenden (<http://www.fruitfly.org/>). Darüber hinaus zeigen Analysen bisher veröffentlichter Protein-Funktionen und -Strukturen, ob eventuell interessante Domänen und Charakteristika in den entsprechenden Proteinen bezüglich einer möglichen Funktion in der Myogenese vorhanden sind (<http://flybase.org/> und <http://smart.embl-heidelberg.de/>). Weitere Datenbanken führen putative Interaktionspartner auf durch eine Sammlung von Daten verschiedener Interaktions-‘Screens’, wobei der Zugriff hier nur eine indirekte Vermutung über die Funktion des gesuchten Gens zulässt (u.a. <http://www.droidb.org/>). Einige ORFs interessanter Gene wurden anschließend mit einer UAS-Sequenz in einen *Drosophila*-spezifischen Transformationsvektor kloniert, um nach Injektion in *Drosophila* diese transgenen Fliegen für Rettungsexperimente oder Überexpressionsstudien zu nutzen (siehe zu diesem Thema Kapitel 4.2.5 und Abb. 10). Eine Übersicht der Gene und der anschließend klonierten Konstrukte befindet sich im Anhang (A.1 bzw. A.5).

### 5.5.1 Es liegen viele Gene in der Region 32F2-33A1

Die genomische Region 32F2-33A1 umfasst einen recht großen Bereich und hier sind nach der Internet-Datenbank Flybase ca. 30 proteinkodierende Gene postuliert (Abb. 24, <http://flybase.org/>). Es ist keine geeignete molekular charakterisierte Deletion vorhanden, so kann zunächst zur Abschätzung werden, wieviele Kandidatengene in Betracht kommen. Aufgrund der hohen Anzahl von Genen fand eine Datenbank-gestützte Vorselektion der zu untersuchenden Gene statt. Die Gesamtheit der Gene ist mit der postulierten Funktion, ihrer putativen Domänen und möglichen Interaktionspartner als Tabelle im Anhang dargestellt (siehe Anhang A1.1). Aufgrund dieser Charakteristika und des möglichen Vorhandenseins von cDNAs bzw. Mutanten wurden einige Gene ausgewählt und näher untersucht (siehe Anhang A1.1).

**5.5.1.1 Viele der untersuchten Gene zeigen keine spezifische RNA-Expression im Embryo** Viele der ausgewählten Gene (*CG14937*, *CG6509*, *CG6488*, *Tsp33B* und *giacomo*) sind nicht im Embryo exprimiert. Daher wird hier auf eine Abbildung verzichtet und nur die Auswahl-

kriterien kurz beschrieben. Das *CG14937* zeigt ein interessantes RNA-Expressionsmuster, dargestellt in der *in situ*-Hybridisierungs-Datenbank (<http://www.fruitfly.org/cgi-bin/ex/insitu.p1>). In dieser Datenbank sind die embryonalen RNA-Expressionsmuster eines Großteils der putativen ORFs des *Drosophila*-Genoms dargestellt. Bei *CG14937* zeigt sich eine Expression im frühen invagierenden Mesoderm bis Stadium 9/10. Später wird die Expression aber schwächer und beschränkt sich auf den Bereich der Epidermis. Allerdings bestätigte sich diese Expression durch selbst durchgeführte *in situ*-Hybridisierungen nicht, so dass auf eine weitere Analyse verzichtet wird. *CG6509* kodiert für ein Protein mit einer putativen SH3-Domäne, welche in spezifischen Protein-Interaktionen involviert ist (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). Mesoderm-relevante Proteine wie Crk und Mbc besitzen ebenfalls SH3-Domänen. Daher wurde das Expressionsmuster von *CG6509* analysiert. Es zeigte sich allerdings ebenfalls keine Embryo-spezifische Expression nach Durchführung von *in situ*-Hybridisierungen, so dass dieses Gen für weitere Analysen gleichfalls nicht Betracht gezogen wird.

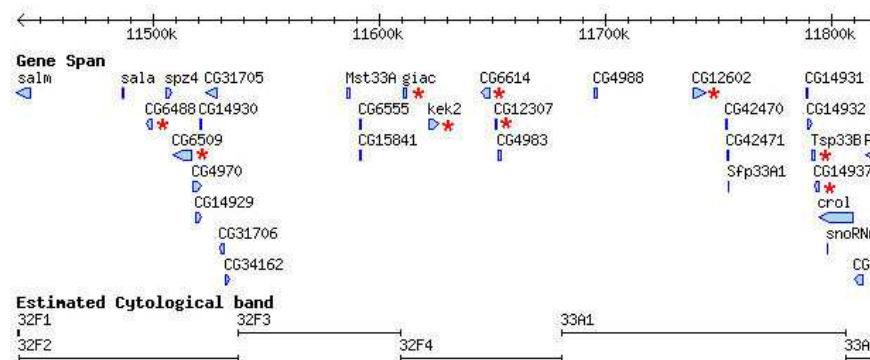


Abbildung 24: **Der genomische Bereich 32F2-33A1 umfasst eine Vielzahl von Genen.** Im Bereich 32F2-33A1 ist die Mutation *32F-sm* lokalisiert. Die mit einem Sternchen markierten Gene sind für weitere Analysen ausgewählt worden. Die genaue Auflistung befindet sich im Anhang (siehe A.1.1). Dabei konnten *salm* (links) und *crol* (rechts) außer Acht gelassen werden, da sich deren ORF nicht komplett in dem untersuchten Bereich befinden.

*CG6488* besitzt die Kodierungskapazität für eine Dor1-ähnliche Domäne. Dor1-ähnliche-Domänen sind am Vesikeltransport an den Golgi-Apparat beteiligt (White & Munro 2001). Da die Lyse von Vesikeln zur Auflösung des Präfusionskomplexes ein während der Myoblastenfusion wichtiger Prozess ist, bietet sich eine Analyse von *CG6488* an. Auch nach mehrmaligen Durchführungen von *in situ*-Hybridisierungen konnte hier kein Embryo-spezifisches Signal gezeigt werden. Die RNA-Expression von Tsp33B wurde untersucht, weil Tetraspanine als integrale Membranproteine die Rekrutierung von Rezeptoren an die Membranen unterstützen. Sie sind in Signalwegen involviert, in denen u. a. Fusionen eine Rolle spielen (Miyado 2000). *In situ*-Hybridisierungen mit *tsp33B*-spezifischen RNA-Sonden konnten kein Embryo-spezifisches Signal zeigen, was darauf schließen lässt, dass Tsp33B keine mesodermal-spezifische Funktion zu haben scheint.

**5.5.1.2 Die RNAs von *CG12602*, *CG6614* und *kekkon-2* sind im Embryo von *Drosophila* exprimiert** Im Folgenden werden diejenigen Gene aufgeführt, welche eine RNA-Expression im Embryo zeigten. *CG12602* ist in einem Bereich des Endoderms im vorderen und im hinteren Teil, sowie im Hinterdarm exprimiert (Abb. 25, Pfeile in B und C). Es erinnert in seiner Expression an Segmentidentitätsgene wie *Ubx* (Bienz & Tremml 1988).

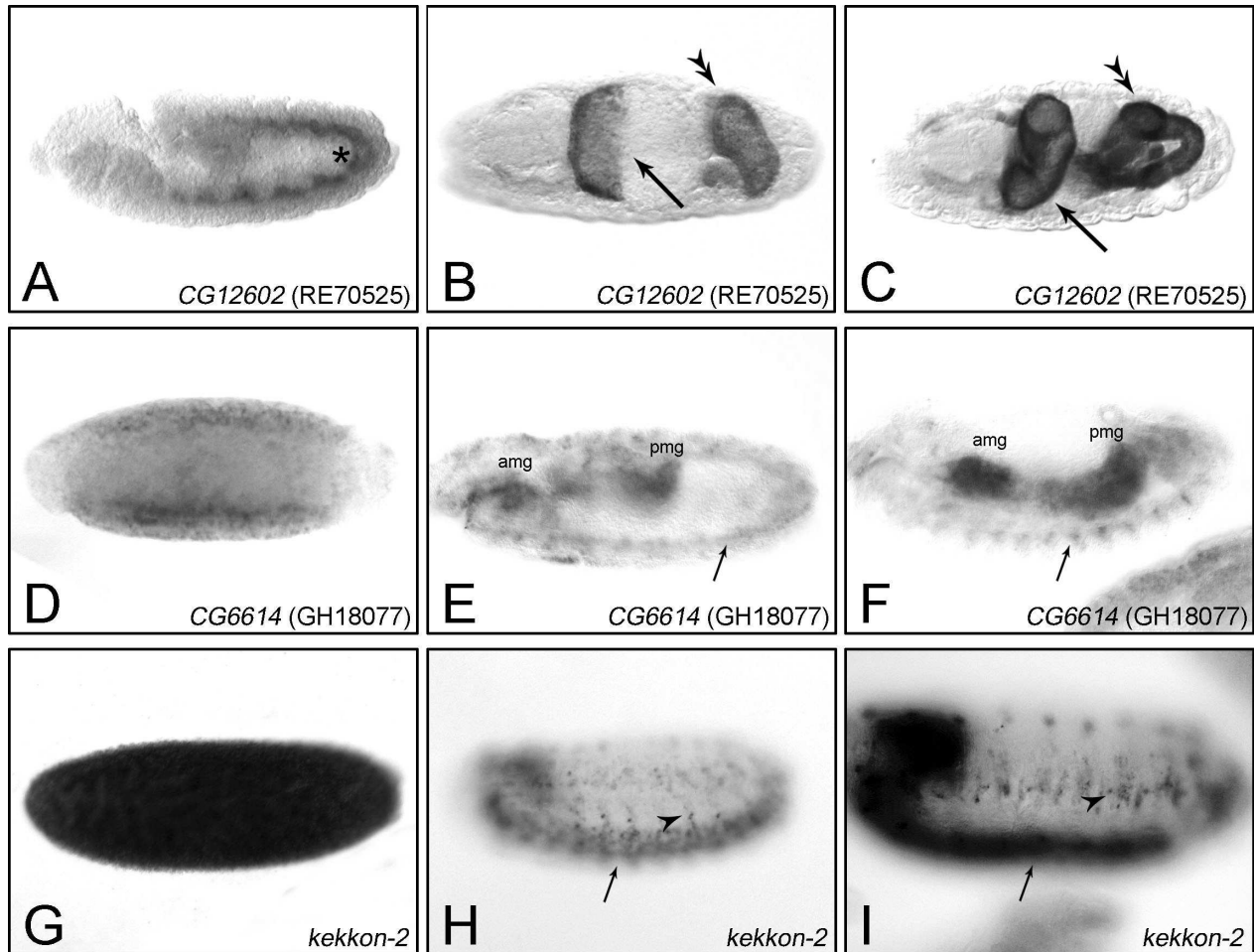


Abbildung 25: Die meisten RNAs ausgewählter Gene aus der Region 32F2-33A1 sind **nicht im Mesoderm exprimiert**. Die mRNA von *CG12602* ist in Stadium 9/10 im Bereich des entstehenden Mesoderms exprimiert (Stern in A). Allerdings bleibt diese Expression nicht bestehen und in den Stadien 15 bis 17 ist eine eindeutige Lokalisation auf der Seite des Endoderms im Bereich der ersten Konstriktion des Mitteldarms (Pfeile in B und C) und im Hinterdarmbereich (Doppelpfeilköpfe in B und C) zu erkennen, welche bis zum Ende der Embryogenese bestehen bleibt. Die RNA-Expression von *CG6614* beginnt im frühen Embryo vor der Gastrulation ab Stadium 5/6 (D), und es ist eine Lokalisation im frühen Nervensystem bis Stadium 14 (kleine Pfeile) zu erkennen. Eine Expression ist in den gleichen Stadien ebenfalls in den Vorläufergeweben vom anterioren bzw. posterioren Mitteldarm (amg und pmg) zu sehen. Die *kekkon-2*-mRNA ist stark im zellulären Blastoderm exprimiert (G) und die Expression beschränkt sich im Embryo in den Stadien 15 bis 17 spezifisch auf den Bereich des ZNS und PNS (Pfeile bzw. Pfeilköpfe in H und I).

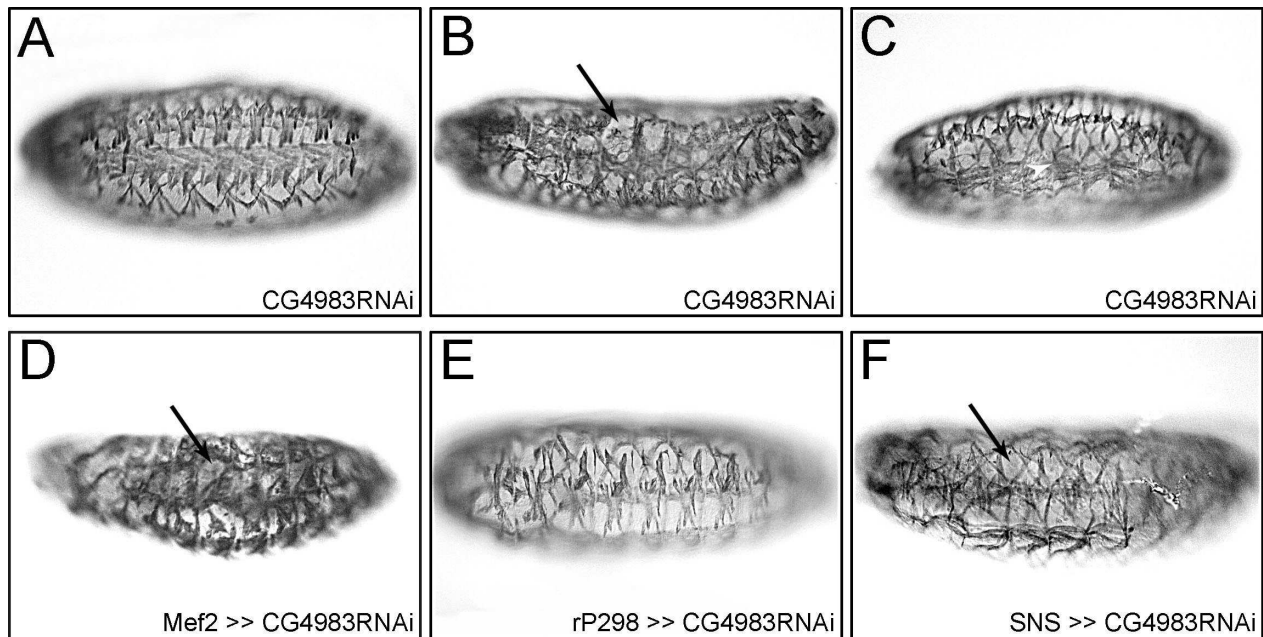
Das Protein von CG12602 besitzt eine putative ATPase-Domäne und scheint daher am ATP-Synthese-gekoppelten Protonentransport beteiligt zu sein (<http://flybase.org/> und <http://smart.embl-heidelberg.de/>). Die Synthese von ATP als Energieträger ist ein wichtiger Faktor in vielen Entwicklungsprozessen, so dass eine Funktion von CG12602 in der Myogenese nicht von vorne herein ausgeschlossen werden kann. In früheren Stadien ist möglicherweise eine Expression im Bereich zu sehen, in dem u. a. das frühe Mesoderm eingewandert ist (Abb. 25, A Stern). Allerdings kann diese Expression in den hier interessanten fusionsrelevanten Stadien nicht mehr beobachtet werden, so dass deshalb dieses Gen nicht weiter analysiert wird. *CG6614* kodiert für ein Protein mit einem in Protein-Interaktionen involvierten TPR-’Repeat’ (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) und die mRNA ist spezifisch im ZNS exprimiert (Abb. 25, Pfeile in E und F). Im Mesoderm ist keine Expression zu beobachten. Im frühen Embryo ist eine Expression in den invaginierenden Zellen zu erkennen, allerdings kann hier nicht genau bestimmt werden, um welche Zellen es sich hier handelt (25, D). Ebenso ist eine Expression in den anterioren und posterioren Mitteldarm-Vorläufer-Geweben (amg - ’anterior midgut primordium’ bzw. pmg - ’posterior midgut primordium’) zu beobachten (Abb. 25, E und F). Ab Stadium 14/15 ist keine Expression mehr nachweisbar. Für die weiteren Analysen ist *CG6614* daher nicht relevant.

Kekkon2 (*Kek2*) ist ein Ig-Domänenprotein. Da fusionsrelevante Proteine wie Duf/Kirre und SNS ebenfalls Ig-Domänen besitzen, sollten *in situ*-Hybridisierungen mit der mRNA von *kek2* zeigen, ob vielleicht ein weiterer Ig-Faktor für die Myogenese notwendig ist. Da keine cDNA vorhanden war, wurde der ORF zur Sondenherstellung in den TOPO-Vektor kloniert. Neben einem abundanten maternal-kodierten Transkript ist die mRNA von *kek2* im ZNS und PNS exprimiert, aber nicht im mesodermalen Gewebe (Abb. 25, G bis I). Eventuell sind die bereits an die Epidermis gehefteten Muskelenden markiert, wobei dies näher zu untersuchen ist (Abb. 25, Pfeilköpfe in H und I).

**5.5.1.3 Das Myosin-ATPase-Domänenprotein CG4983 interagiert mit Arp1, zeigt aber keine Expression im Embryo** Die *in situ*-Hybridisierungen mit CG4983 ergaben keine Expression dieses Gens im Mesoderm, allerdings wird in Proteindomänen-Datenbanken eine Myosin-ATPase-Domäne angezeigt (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). Dieses auch als Motordomäne bezeichnete Motiv ist wichtig u. a. für Myosin-basierte Bewegungen (Cope *et al.* 1996) und CG4983 und das von diesem Gen kodierte Protein ist daher näher zu analysieren. Es konnte eine RNAi (RNA-Interferenz)-Linie verwendet werden (Dietzl *et al.* 2007), welche mit verschiedenen mesodermalen Gal4-Treiberlinien aktiviert wurde (siehe hierzu Kapitel 4.2.5 und Abb. 10). Die transgenen Fliegen („RNAi-Fliegen“) enthalten eine repetitiv invertierte Sequenz die zum jeweiligen Gen homolog ist. Werden diese mittels geeigneter Treiber-Linien z. B. im Mesoderm exprimiert, kann diese repetitiv invertierte Sequenz transkribiert werden und an die komplementäre mRNA des CG4983 binden. Dies führt zu einer Unterbindung der Translation.

Als geeignete Treiberlinien wurden D-Mef2-Gal4 für eine Aktivierung des UAS-Konstruktes im mesodermalen Vorläufergewebe, rP298-Gal4 für eine Aktivierung in den FCs und SNS-Gal4 für eine Aktivierung in den FCMs verwendet. Interessanterweise konnten mit  $\alpha$ - $\beta$ 3-Tubulin leichte Defekte im

somatischen Muskelmuster beobachtet werden, allerdings zeigte sich bei einer Kontrollfärbung der nicht-getriebenen RNAi-Linie in einigen Embryonen ebenfalls dieser Phänotyp (Abb. 26). Deshalb ist der hier beobachtete Phänotyp mit Vorsicht zu betrachten.



**Abbildung 26: RNA-Interferenz mit dem CG4983-Transkript zeigt in Stadium 16 Defekte im Mesoderm.** Die RNA-Interferenz-Linie für CG4983 zeigt bereits im nicht getriebenen Zustand in Stadium 16 in einigen Embryonen einen Defekt im somatischen Mesoderm (B und C), während der überwiegende Anteil wildtypisch erscheint (A). Es sind Embryonen mit Unterbrechungen im Muskelmuster einiger Segmenten zu beobachten (Pfeil in B) und in ein paar Fällen scheinen Muskeln vermehrt vorhanden (Pfeilkopf in C). Bei Verwendung von mesodermalen Gal4-Treibern ist in Stadium 16 durch die RNA-Interferenz eine Störung im somatischen Muskelmuster erkennbar (D bis F). D-Mef2-Gal4 treibt in allen Myoblastentypen und hier sind Lücken im Muskelmuster zu sehen (Pfeil in D). Die Verwendung von rP298-Gal4 führt zu einer schwachen Reduktion von Muskelfasern (E). Der mutante Phänotyp bei der Blockade des CG4983-Transkriptes in den FCMs, getrieben mit SNS-Gal4, ist vergleichbar mit der Verwendung des D-Mef2-Gal4-Treibers. Hier sind auch deutliche Unterbrechungen des Muskelmusters zu erkennen (Pfeil in F). Zusätzlich erscheinen die Muskeln dünner (F).

Als Ergebnis aus einem globalen Hefe-Zwei-Hybrid-Experiment ist eine Interaktion des CG4983 mit Arp1 postuliert (Giot *et al.* 2003). Arp1 ist ein aktin-verwandtes Protein (ARPs - 'actin related proteins') und als Bestandteil des Dynactin-Komplexes an dem Mechanismus des Dynein-basierten intrazellulären Transports über Mikrotubuli involviert (Schafer *et al.* 1994; Quintyne *et al.* 1999). Wie bereits in Kapitel 2.5.1 beschrieben, sind Arp2 und Arp3 in einem Komplex mit weiteren Proteinen an der Verknüpfung neuer Aktinverzweigungen beteiligt (Pollard 2007). Zwar ist Arp1 verknüpft an das Mikrotubuli-Netzwerk, aber es gibt Hinweise, dass dieser Cytoskelett-Bestandteil ebenfalls eine Rolle in der Myogenese spielt, wie dies bereits von Guerin und Kollegen anhand von Zellkultur-Experimenten postuliert wurden (Guerin & Kramer 2009). Daher stellt dieser Zusam-



menhang und die mögliche Interaktion zwischen CG4983 und Arp1 einen interessanten Ansatzpunkt weiterer Untersuchungen dar. Aufgrund dessen wurden zwei *Arp1*-Mutanten verwendet, um eine mögliche Relevanz von Arp1 während der Muskelentwicklung zu untersuchen. Eine der *Arp1*-Mutanten ist ein P-Element (PBac{Arp1}), inseriert in den 5' UTR des Arp1-Gens. Aufgrund der daraus folgenden, fehlerhaften Translation führt diese Insertion zu einer embryonalen Letalität der Fliegenlinie in homozygoter Situation.

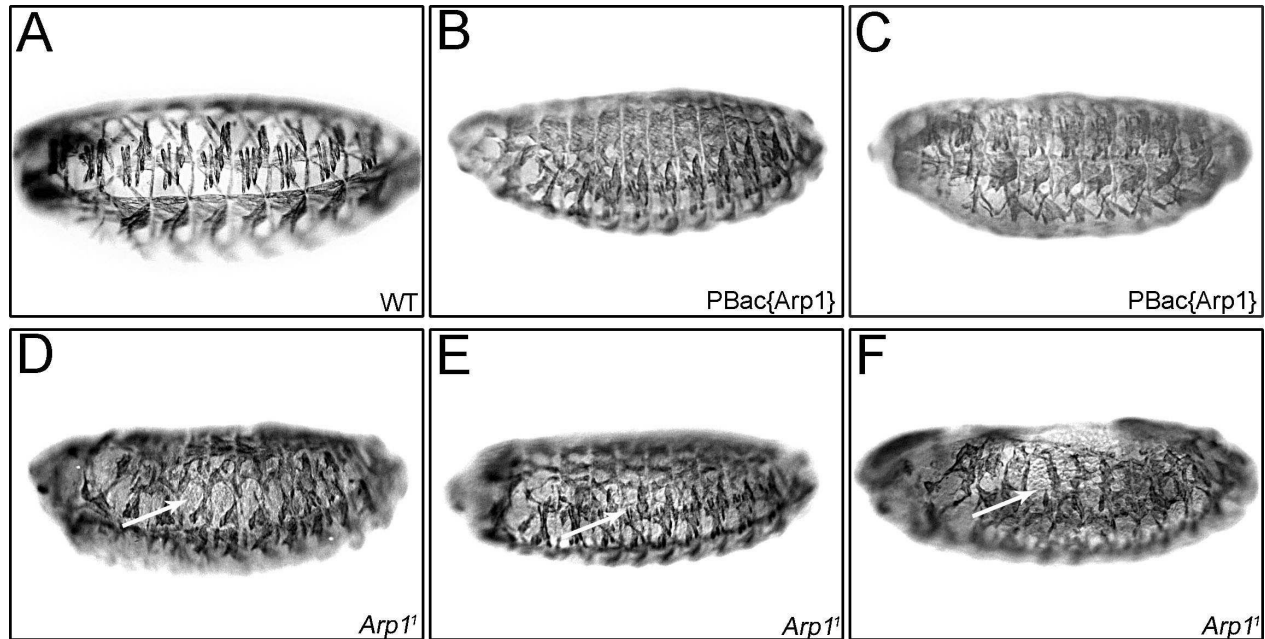
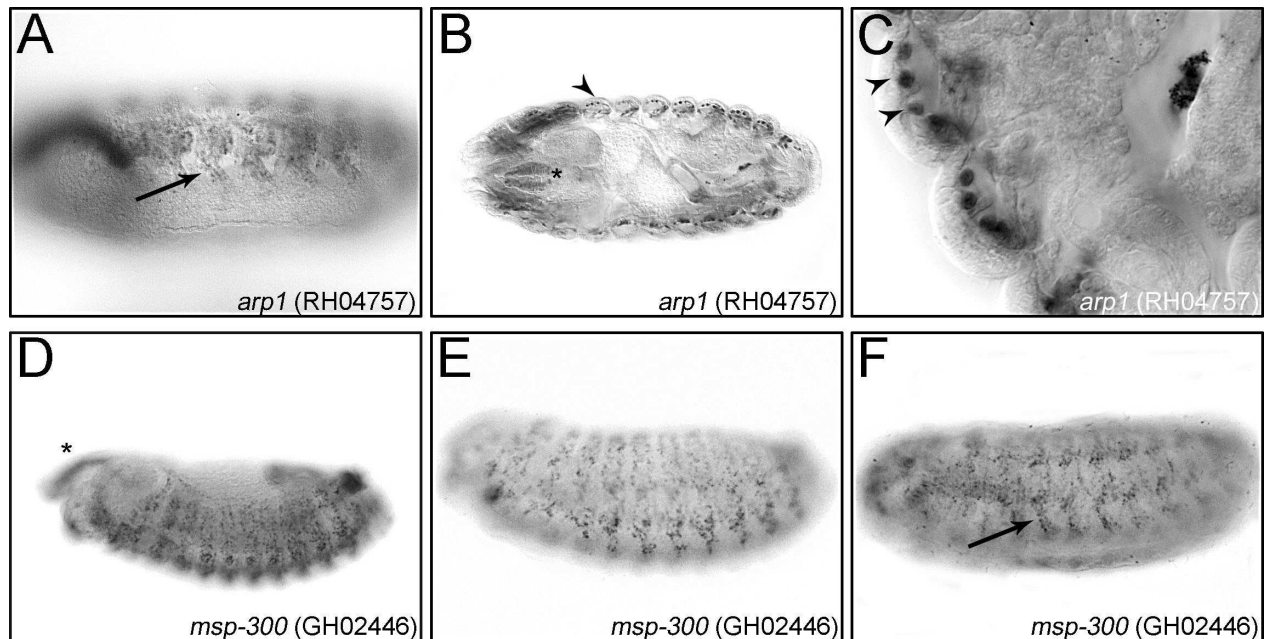


Abbildung 27: Die Embryonen der P-Element-Mutante von *Arp1* zeigen ein wildtypisches Muskelmuster während die *Arp1*<sup>1</sup>-mutanten Embryonen Defekte in der somatischen Muskulatur aufweisen. Die P-Element-Mutante PBac{Arp1} hat im Vergleich zum Wildtyp (A) in Stadium 16 keine Störungen in der somatischen Muskulatur (B und C). Die larval letale Mutante *Arp1*<sup>1</sup> hingegen ist eindeutig in der Entwicklung der somatischen Muskulatur gestört. Hier sind Unterbrechungen des Muskelmusters in Stadium 16 zu beobachten (Pfeile in D bis F). In D und E scheinen in einigen Segmenten immer die gleichen Muskeln zu fehlen. Die Muskeln sind normal ausgebildet und inserieren an der richtigen Stelle in die Epidermis (D und E). In einigen Fällen ist gleichfalls die Anordnung der vorhandenen Muskeln gestört (F).

Die zweite *Arp1*-Mutante (*Arp1*<sup>1</sup>) wurde freundlicherweise vom Goldstein-Labor (Koundakjian *et al.* 2004; Haghnia *et al.* 2007) zur Verfügung gestellt. Die genaue molekulare Mutation ist nicht bekannt, aber die homozygoten Mutanten sind nicht embryonal, sondern larval letal. Hier finden sich zwei interessante Gegensätze in der Analyse der beiden Mutanten.  $\alpha$ - $\beta$ 3-Tubulin-Färbungen zeigten, dass die Embryonen der P-Element-Linie keinen Defekt in der Muskulatur haben (Abb. 27, B und C), während *Arp1*<sup>1</sup>-mutanten Embryonen eindeutig einen mutanten Phänotyp zeigen (Abb 27, D bis F). In *Arp1*<sup>1</sup> sind Unterbrechungen des somatischen Muskelmusters zu beobachten (Abb. 27, Pfeile in D bis F). In diesem Fall sind die vorhandenen Muskeln wildtypisch gebildet und inserieren an der richtigen Stelle in die Epidermis. In einigen Fällen scheint es, als ob in einigen Segmenten die gleichen

Muskeln fehlen (Abb. 27, D). In wenigen Embryonen ist zusätzlich das Muskelmuster gestört (Abb. 27, F).

Arp1 interagiert möglicherweise mit Msp-300 (Giot *et al.* 2003), was interessant erscheint, da Msp-300 bereits in der Muskulatur untersucht wurde (Volk 1992; Rosenberg-Hasson *et al.* 1996) und dort in die korrekte Anheftung der Muskeln an die Epidermis involviert ist. Daher wurden die Expressionsmuster beider Gene untersucht (Abb. 28). Die *arp1*-mRNA zeigt eine deutliche Expression in den späten Stadien der somatischen Muskulatur und in der Muskulatur des Pharynx (Abb. 28, A bis C, Pharynx mit Sternchen in B). Früher als Stadium 15/16 ist keine Expression der *arp1*-mRNA zu beobachten und ab dann ist die mRNA von *arp1* kernnahe exprimiert (Abb. 28, Pfeilköpfe in B und C). Die *in situ*-Hybridisierungen mit der mRNA von *msp-300* sind denen mit der *arp1*-mRNA in der somatischen Muskulatur und im Pharynx sehr ähnlich, was die Möglichkeit einer Interaktion zwischen den beiden Proteinen unterstreicht (Abb. 28, D-F). Die RNA-Expression von *msp-300* beginnt etwas früher als die von *arp1* und ist schon ab Stadium 14 in fusionsrelevanten Stadien zu detektieren.



**Abbildung 28: Die mRNAs von *Arp1*- und *Msp-300* sind in späten Embryonalstadien in der somatischen Muskulatur exprimiert.** Vor Stadium 15/16 ist kein Transkript der *arp1*-mRNA detektierbar. In den späten Stadien ist eine *arp1*-mRNA-Expression, lateral betrachtet, in den Muskeln zu erkennen (A). Die Expression erscheint punktuell in den Muskeln (B) und auch im Pharynx (Sternchen in B). Bei größerer Betrachtung ist eine kernnahe RNA-Expression von *arp1* zu sehen (Pfeilköpfe in C). Eine ähnliche Verteilung ist bei *msp-300*-mRNA zu beobachten, wobei die Expression etwas früher ab Stadium 14 beginnt (D). Die mRNA von *msp-300* ist ebenfalls im Pharynx lokalisiert (Sternchen in D). Die punktuelle Verteilung der mRNA ist lateral vergleichbar mit der von *arp1* (vgl. F mit A) und dauert bis zum Ende der Embryonalentwicklung an (F).

Der indirekte Zugang zu CG4983 über Analysen von Arp1 konnte bisher keine Hinweise auf eine Rolle von CG4983 in der Myogenese von *Drosophila* geben. Da die *Arp1*<sup>1</sup>-Mutante aber einen interessanten Muskeldefekt zeigte, lohnt es sich, weitere Analysen dieses Faktors anzustreben.

### 5.5.2 Es liegen sechs Gene in der Region 33E1-33E3

Es folgt die Analyse der Gene in der Region 33E1 bis 33E3. Dies ist der zweite Bereich einer myogenese-spezifischen Mutation und die Mutanten *bubbles*<sup>33E-m</sup> und *33E-vm* sind in diesen Bereich lokalisiert. Laut Internet-Datenbank Flybase sind für 33E1-33E3 insgesamt sechs Protein-kodierende Gene postuliert (Abb. 29). Die überschaubare Anzahl von Genen erleichtert die Analyse, so dass von allen Genen bis auf *pkd2 in situ*-Hybridisierungen an *Drosophila*-Embryonen durchführbar waren. Für *bruno-2* (*bru-2*), *CG17010* und *vir-1* konnte eine kommerziell erhältliche cDNA verwendet werden, während für *CG31862* und *CG31763* der gesamte offene Leserahmen (open reading frame - ORF) und ein Teil von *pkd2* über PCR an genomischer DNA amplifiziert in einen Klonierungsvektor ligiert wurde, wodurch eine RNA-Sondenherstellung möglich war. Für alle Gene bis auf *pkd2* konnte ein RNA-Expressionsmuster gezeigt werden. Es wurde ein Pkd2-Antikörper und eine *Pkd2*-Mutante für Analysen verwendet (Watnick *et al.* 2003). Schließlich wurden die ORFs von *CG31862*, *bru-2*, *CG17010* und *CG31763* mit einer UAS-Sequenz in einen *Drosophila*-Transformationsvektor kloniert, um diese ORFs in Fliegen exprimieren zu können. Ein UAS-Pkd2-Konstrukt ist freundlicherweise zur Verfügung gestellt worden (Watnick *et al.* 2003). Das *Vir1*-Gen (*vir1* - *virus induced RNA 1*) zeigte eine eindeutige RNA-Expression im ZNS und ist daher für weitere Analysen nicht herangezogen worden (Daten nicht gezeigt).

Pkd2 (Pkd2 - Polycystic kidney disease gene 2) besitzt die Kodierungskapazität für einen Kalzium-aktivierbaren Ca<sup>2+</sup>-permeablen Kationenkanal, während Bruno-2 aufgrund vorhandener RNA-Erkennungsdomänen ein RNA-Bindeprotein darstellt. Das CG17010 besitzt eine postulierte PfkB-Domäne, welche hauptsächlich in Ribokinasen vorkommt. CG31862 und CG31763 sind zwei kleine Peptide mit einem Molekulargewicht von 20 bzw. 14 kDa und können so eventuell als Signalpeptide oder -moleküle dienen. Tatsächlich wird für CG31862 eine Signalpeptid-Sequenz vorhergesagt (<http://www.expasy.ch/prosite/>).

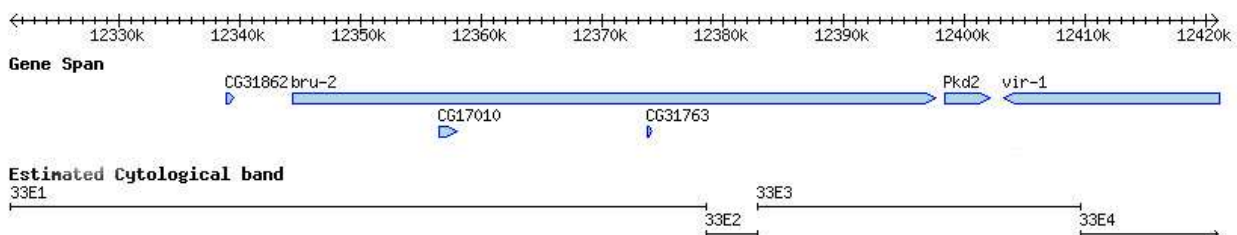


Abbildung 29: Der genomische Bereich von 33E1-33E3 umfasst sechs putative Gene. In diesen Bereich sind die Mutationen in *bubbles*<sup>33E-m</sup> und *33E-vm* lokalisiert.

**5.5.2.1 *CG31862* wird spezifisch in den Tracheen exprimiert** *In situ*-Hybridisierungen mit einer Sonde des gesamten ORFs von *CG31862* zeigt eine deutliche RNA-Expression in den bereits differenzierten Tracheen von *Drosophila*-Embryonen in Stadium 16/17 (Abb. 30, A bis D). Eine häufige artifizielle Färbung bei *in situ*-Hybridisierungen ist das Reinlaufen der Sonde in das Lumen der Tracheen. Aber eine vergrößerte Darstellung der Tracheen zeigt, dass es sich hier nicht um ein Artefakt handelt, da nicht das Lumen gefärbt ist, sondern vor allem die Tracheenwände (Abb. 30, Pfeilkopf in E). Vor Stadium 16/17 ist das Transkript von *CG31862* nicht nachzuweisen. Aufgrund dieser Daten kann von einer Rolle von *CG31862* in der Muskulatur abgesehen werden, aber eine bereits durchgeführte Klonierung von UAS-*CG31862* mit einem HA-Anhang erlaubt die Analyse dieses Gens in der Tracheenentwicklung. Hier erwies sich aber der Nachweis des Konstruktes in den transgenen Fliegen als schwierig. Eine Kontrollkreuzung von UAS-*CG31862* mit Wg-Gal4 zeigte keine Färbung mit dem HA-Antikörper im Expressionsbereich von Wingless, obwohl eingehende Sequenzanalysen eine korrekte Translation des Proteins mit dem HA-Anhang vorhersagen. Es ist anzunehmen, dass der einfache HA-Anhang nicht ausreicht, um diesen mit dem HA-Antikörper zu detektieren.

Die Domänenanalyse ergibt keine prominenten Motive außer einer Signalpeptidsequenz. Das Signalpeptid, oft als N-terminale Sequenz, gibt den Bestimmungsort und den Transportweg des neu translatierten Proteins innerhalb einer Zelle zu seinem Bestimmungsort an. Meist sind diese Proteine schließlich in Membranen oder Kompartimenten wie ER, Mitochondrien oder Zellkernen integriert (Izard & Kendall 1994).

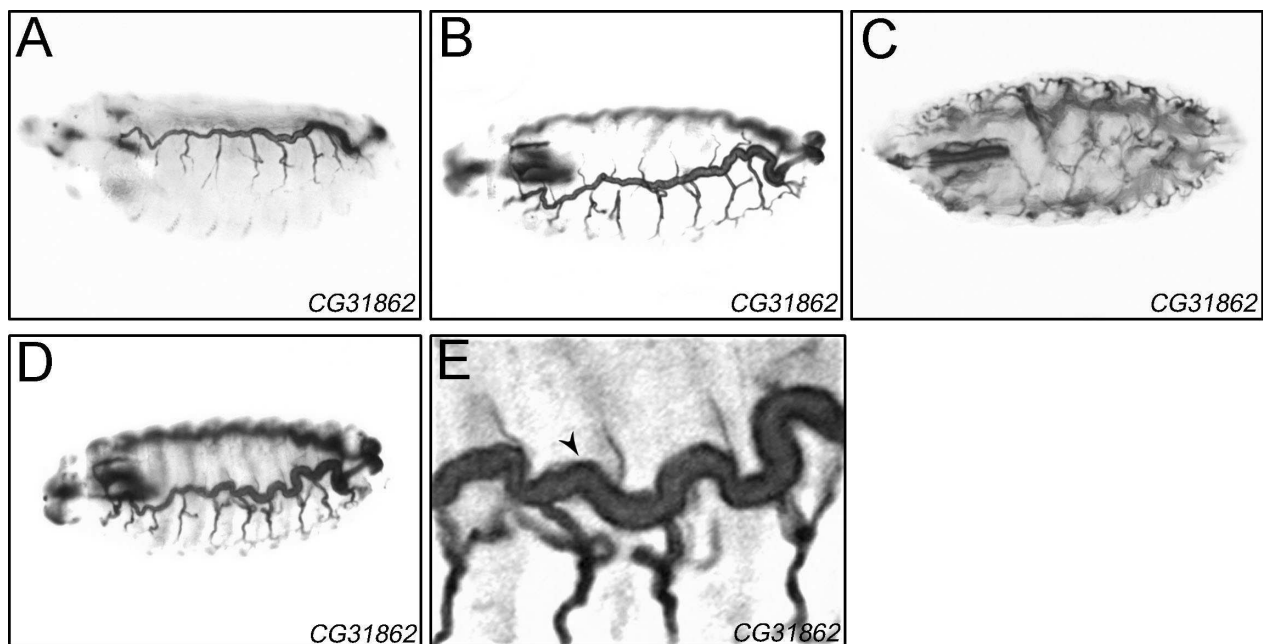


Abbildung 30: ***CG31862* ist in den Tracheen transkribiert.** Die Expression von *CG31862* beschränkt sich auf die in Stadium 16/17 bereits ausgebildeten Tracheen (A bis D). Es konnte gezeigt werden, dass es sich nicht um ein Artefakt im Lumen der Tracheen handelt, sondern die Expression an den Tracheenwänden lokalisiert ist (Pfeilkopf in E).

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass das CG31862 zwar nicht mesoderm-relevant, aber während der Embryonalentwicklung möglicherweise in den Tracheen benötigt wird. Die späte Expression spricht zwar eher für eine physiologische als für eine entwicklungsrelevante Rolle, aber die vorhandenen Konstrukte und die Möglichkeit, eine RNAi-Linie von CG31862 zu verwenden, erlauben weitergehende Analysen der Funktion von CG31862 in der Tracheenentwicklung. Anwendbare Gal4-Treiber, spezifisch für die Tracheen sind Breathless-, bzw. Branchless-Gal4, welche zu unterschiedlichen Zeiten während der Entwicklung in den Tracheen aktiv sind.

**5.5.2.2 Die RNA von *bruno-2* wird im Endoderm und den Malpighischen Gefäßen exprimiert** Bruno-2 gehört zur Klasse der RNA-Bindeproteine und kann daher an vielen Prozessen wie der RNA-Prozessierung, mRNA-Transport, -Stabilität oder -Translation beteiligt sein (Siomi & Dreyfuss 1997). Eine prominente Domäne ist das RNA-Erkennungsmotiv (RNA recognition motif -RRM). Es reicht zwar eine RRM zur RNA-Bindung aus, aber oft treten diese Domänen gehäuft auf, wie z. B in Bruno-2 mit drei RRM's (Birney *et al.* 1993). Neben diesen Funktionen vermitteln RRM's auch Protein-Protein-Interaktionen (Wang *et al.* 1997; Samuels *et al.* 1998; Sakashita & Sakamoto 1996).

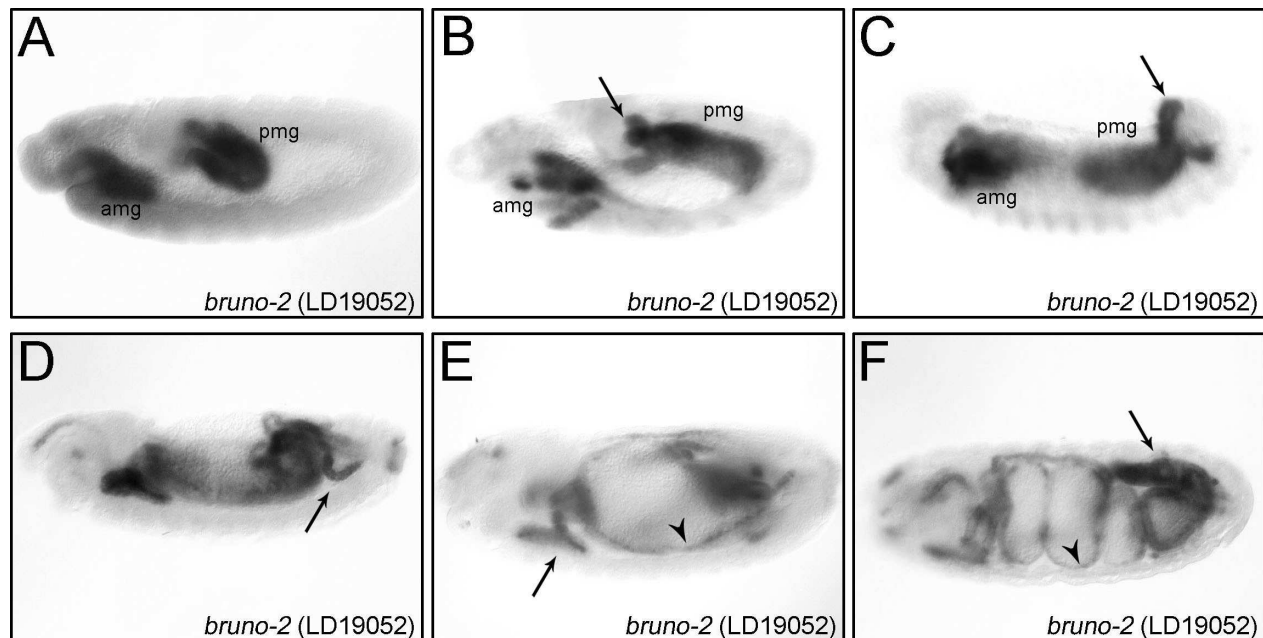


Abbildung 31: Die mRNA von *bruno-2* (*bru-2*) ist im Endoderm und den Malpighi-Gefäßen transkribiert. *bru-2* zeigt eine Expression ab Stadium 8/9 bis zum Ende der Embryogenese in Stadium 17. Die Expression ist ab Stadium 8 spezifisch in den Vorläuferzellen des Endoderms, den Vorder- und Hinterdarm-Primordien zu beobachten (anterior midgut - amg und posterior midgut - pmg; A bis C). Ab Stadium 9/10 beginnt ebenfalls die RNA-Expression von *bru-2* in den Vorläufern der Malpighi-Gefäßen (Pfeile in B bis F), welche zusammen mit der endodermalen Expression bis Stadium 17 aufrecht gehalten wird (D-F).

Bruno-2 ist ein Ortholog des menschlichen CUG-Bindeproteins (CUG-BP), welches im Verlauf der Krankheit Myotone Dystrophie Typ1 (DM1) eine entscheidende Rolle spielt. DM1 ist eine neuromuskuläre Erkrankung mit CTG-Triplet-Erweiterungen in dem Gen der Myotonin-Proteinkinase. Nach der Transkription der Myotonin-Proteinkinase mit einer erhöhten Anzahl von CUG-Wiederholungen erkennen spezifische RNA-Bindeproteine wie CUG-BP diese Wiederholungen, was in eine abnormale RNA-Prozessierung resultiert (Harley *et al.* 1992).

Die mRNA von *bruno-2* (*bru-2*) ist in *Drosophila*-Embryonen im Endoderm und in den Malpighischen Gefäßen lokalisiert (Abb. 31). Es ist keine maternale Komponente vorhanden. Die Expression beginnt in Stadium 8 im ausgestreckten Keimstreif im Endoderm im Vorläufergewebe des Vorder- und Mitteldarms (Abb. 31, amg und pmg in A). Im Zuge des Keimstreif-Rückzuges in den Stadien 9 bis 14 bleibt die Expression in diesen Vorläufern bestehen und die sich entwickelnden Malpighischen Gefäße zeigen ebenfalls eine RNA-Verteilung von *bruno-2* (Abb. 31, Pfeile in B-F). In den Embryonen ab Stadium 15 ist die Expression im Endoderm um den Darm erkennbar und bleibt bis zum Ende der Embryogenese in Stadium 17 in diesem Gewebe sowie in den Malpighischen Gefäßen bestehen (Abb. 31, E und F). Das Expressionsmuster lässt vermuten, dass Bruno-2 eine Funktion für die Entwicklung des Endoderms und der Malpighischen Gefäße besitzt.

**5.5.2.3 Die mRNA von *CG31763* wird in den Garlandzellen und Speicheldrüsen exprimiert** Von der Proteinsequenz ausgehend lässt sich über CG31763 keine Aussage treffen, da keine prominenten Domänen vorhergesagt werden. Daher wurden *in situ*-Hybridisierung durchgeführt. Die *CG31763*-mRNA ist ab Stadium 12/13 in den Garlandzellen, Speicheldrüsen und im Hinterdarm detektierbar (Abb. 32, B und C). Zusätzlich ist in Stadium 3/4 ein Paarregel-Gen ähnliches Muster zu beobachten (Abb. 32, A). Eine Lokalisation der RNA im Mesoderm konnte nicht beobachtet werden. Die Relevanz von CG31763 in den Garlandzellen wurde mit dem Marker HRP (Horse Radish Peroxidase - Meerrettich-Peroxidase) weiter analysiert. Die Embryonen der Defizienz Df(2L)ED775 in *trans* über Df(2L)BSC407 zeigen, dass hier im Vergleich Wildtyp keine Garlandzellen mehr mit HRP markiert sind (Abb. 32, E und F). Da HRP zusätzlich das ZNS markiert, ist in den transheterozygoten Embryonen durch den recht großen deletierten Bereich neben dem Garland-Zell- einen ZNS-Defekt zeigt (Abb. 32, vergleiche D mit E und F). Allerdings färbt HRP die bereits determinierten Garlandzellen und so besteht die Möglichkeit, dass die Determination der Garlandzellen in den transheterozygoten Embryonen von Df(2L)ED775/Df(2L)BSC407 noch stattfindet, die Differenzierung aber von CG31763 kontrolliert wird und deshalb keine HRP-Färbung in den Garlandzellen zu sehen ist. Aufgrund dessen wurde eine mit *rP298lacZ*-markierte Df(2L)ED775-Linie, mit  $\alpha$ - $\beta$ -Galaktosidase und  $\alpha$ -HRP gefärbt. Die Garlandzellen-Vorläufer sind im Wildtyp mit dem Marker *rP298lacZ* schon ab Stadium 12/13 detektierbar, aber es sind keine Garlandzellen in Df(2L)ED775/Df(2L)BSC407-Embryonen zu beobachten, und so ist anzunehmen, dass bereits die Determination der Garlandzellen gestört ist (Daten nicht gezeigt).

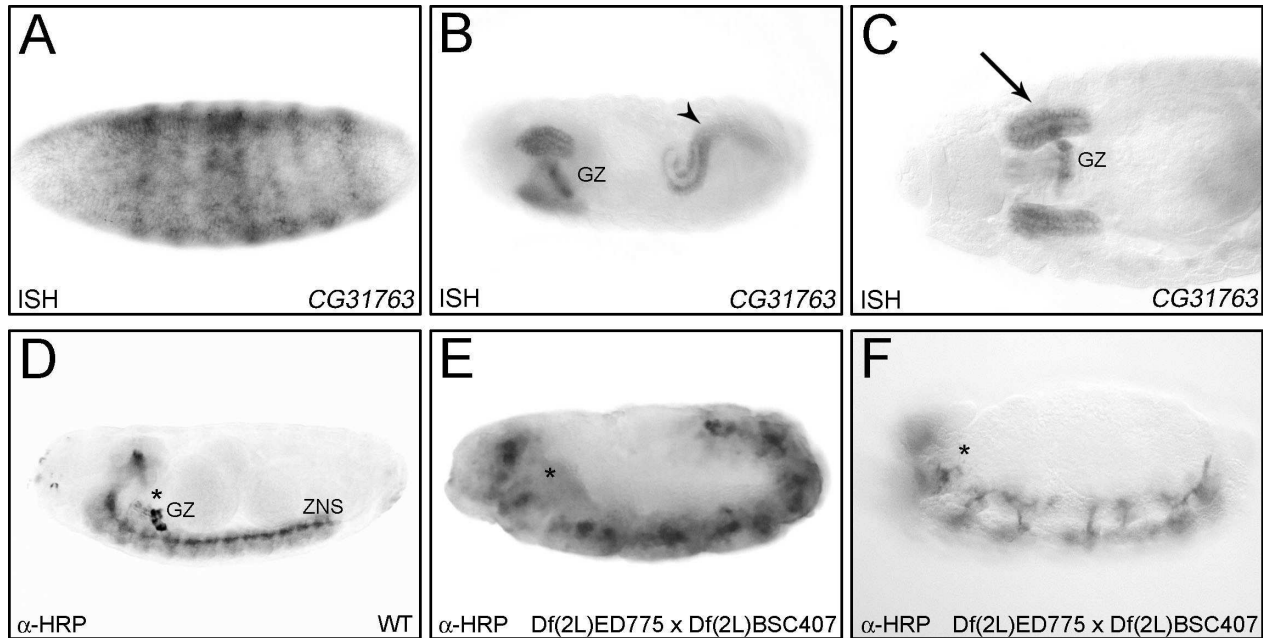
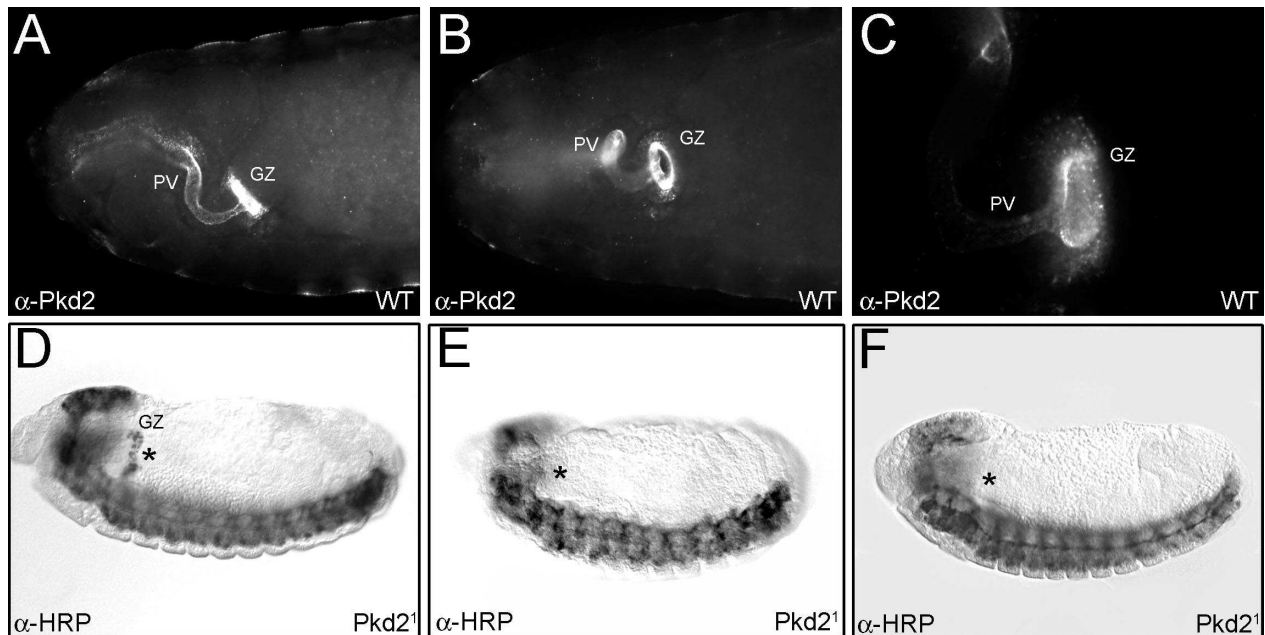


Abbildung 32: *CG31763* ist in den Garlandzellen, im Hinterdarm und den Speicheldrüsen exprimiert und *CG31763*-defiziente Embryonen weisen keine Garlandzellen auf. *CG31763* ist in Stadium 3/4 im Muster eines Paarregel-Gens in sieben Streifen exprimiert (A). In Stadium 15/16 ist die mRNA von *CG31763* deutlich im Hinterdarm (Pfeilkopf in B) und in den Speicheldrüsen (B und Pfeil in C) sowie in den Garlandzellen (GZ in B und C) exprimiert.  $\alpha$ -HRP markiert im Wildtyp ab Stadium 16 die Garlandzellen (GZ und Sternchen in C) und das ZNS (ZNS in D). In transheterozygoten Embryonen von Df(2L)ED775/Df(2L)BSC407 ist nur die Färbung des in den mutanten Embryonen rudimentär ausgebildete ZNS zu sehen, während die Garlandzellen nicht mehr vorhanden sind (übliche Position der GZs mit Sternchen gekennzeichnet in D bis F).

Die Garlandzellen (GZ) stellen eine Subpopulation der Nephrozyten in *Drosophila* dar, welche neben den Perikardzellen und den Malpighischen Gefäßen das Exkretionssystem bilden (Crossley 1985). Ca. 25-30 eng assoziierte binukleäre GZs umgeben das anteriore Ende des Proventrikulus an dessen Übergang zum Ösophagus (Aggarwal & King 1967). Die kortikale Region der Zellen besitzt Kanäle, welche durch die Invagination der Plasmamembran während der Embryogenese und frühen Larvenstadien entstehen. Die GZs sind sehr aktiv in der Vesikel-Endozytose (Wigglesworth 1972). Da die GZs dem 'Slit Diaphragma' der Vertebraten-Niere ähneln, wird ihnen als Detoxifizierungsmaschinerie eine Aufgabe zur Entfernung von Abfallprodukten aus der Hämolymphe zugesprochen (Aggarwal & King 1967; Crossley 1985). Darüber hinaus sind die bereits beschriebenen Proteine SNS und Duf/Kirre in den GZs exprimiert und spielen dort eine Rolle in der Adhäsion der GZs und der Fusion in binukleäre Zellen (Zhuang *et al.* 2009). Infolge dessen ergeben sich interessante Ansatzpunkte für eine weitere Analyse dieses bisher nicht beschriebenen Gens speziell in der Entwicklung der Garlandzellen.

**5.5.2.4 Pkd2 wird in den Garlandzellen und im Proventrikulus exprimiert** Die Polycystische Nierenerkrankung (PKD - Polycystic kidney disease) ist eine erbliche Erkrankung des Menschen u. a. mit renalen Zystenbildungen. *Drosophila* Pkd2 (Polycystic kidney disease gene 2) gehört zur Pkd-Familie von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aktivierten  $\text{Ca}^{2+}$ -permeablen Kationenkanälen und besitzt eine physiologische Rolle in der Kontraktion von glatten Muskelzellen und in der Spermiogenese. Die Spermien sind motil, erreichen aber nicht die weiblichen Spermien-Sammelorgane. Daher wird eine Funktion in den Spermien-Flagella und hier speziell in den Axonem-Strukturen vermutet. Das Protein von Pkd2 ist an den posterioren Spitzen der Spermien konzentriert (Watnick *et al.* 2003; Gao *et al.* 2003). Eine embryonale Expression von Pkd2 ist bisher nicht beschrieben worden. Mit einem Pkd2-Antikörper (Watnick *et al.* 2003) konnte hier gezeigt werden, dass Pkd2 im Embryo in den Garlandzellen und den daran angrenzenden Proventrikulus verteilt ist (Abb. 33, A bis C). Dies ist insofern interessant, da *CG31763* ebenfalls in den Garlandzellen exprimiert ist, wie der vorangegangene Abschnitt beschreibt. Neben dem Antikörper war die Analyse einer *Pkd2*-Mutante (*Pkd2*<sup>1</sup>) möglich (Watnick *et al.* 2003). Diese Mutante wurde durch homologe Rekombination generiert und die molekulare Analyse zeigte den Austausch einer Base (Watnick *et al.* 2003). In *Pkd2*<sup>1</sup> ist, im Vergleich mit dem Wildtyp, keine Expression von HRP in den Garlandzellen zu beobachten (Abb. 33, vergleiche D mit F). An dieser Stelle steht allerdings noch eine Färbung mit  $\alpha$ -HRP und  $\alpha$ - $\beta$ -Galaktosidase an *Pkd2*<sup>1</sup>-Mutanten eingekreuzt in die rP298*lacZ*-Enhancer-Trap-Linie aus, um einen durch das Fehlen von *pkd2* möglichen Determinationsdefekt der Garlandzellen zu untersuchen.



**Abbildung 33: Pkd2 ist in den Garlandzellen und dem Proventrikulus exprimiert und *Pkd2*-defiziente Embryonen zeigen keine differenzierten Garlandzellen.**  $\alpha$ -Pkd2 ist im Embryo ab Stadium 15 spezifisch in den Garlandzellen (GZ) und dem anterior liegenden Proventrikulus (PV) exprimiert (A bis D). Eine  $\alpha$ -HRP-Färbung an *Pkd2*<sup>1</sup>-Mutanten konnte, im Vergleich zum Wildtyp (D), keine Garlandzellen mehr zeigen (E und F).



### 5.5.3 Zusammenfassung der differenzierten Analyse von ausgewählten Genen der genomischen Bereiche 32F2-33A1 und 33E1-33E3

Es zeigte sich, dass die bisher untersuchten Gene offensichtlich keine Funktion in der Entwicklung der Muskulatur von *Drosophila* besitzen, obgleich interessante Expressionsmuster zu beobachten waren, welche auf andere Entwicklungsprozesse hindeuten. So ist die mRNA von *bruno-2* im Endoderm und den malpighischen Gefäßen exprimiert, während aller Wahrscheinlichkeit nach CG31763 und Pkd2 eine Funktion in der Entwicklung der Garlandzellen besitzen. Die hier möglichen weiterführenden Experimente lassen sich in späteren Untersuchungen fortsetzen, da die notwendigen Konstrukte und transgenen Fliegen existieren. Für die Region 32F2-33A1 lässt sich kein Kandidat für eine mögliche Funktion in der somatischen Myogenese identifizieren. Einzig CG4983 scheint durch die Interaktion mit Arp1 einen Ansatz für weitere Analysen zu liefern. In der Region 33E1 bis 33E3 sind die oben aufgeführten Gene nicht relevant für eine Funktion in der Muskelentwicklung. Es konnte mit CG17010 aber schließlich ein Kandidat gefunden werden, welcher sich für die somatische Mutation von *bubbles*<sup>33E-m</sup> verantwortlich zeichnen lässt. Dies wird im nächsten Abschnitt ausführlich untersucht.

### 5.6 Die Ribokinase *CG17010* (*D-Rbks*<sup>33E</sup>) ist früh mesodermal exprimiert und kann den somatischen Phänotyp von *bubbles*<sup>33E-m</sup> retten

*CG17010* kodiert für ein Protein mit einer Phosphofruktokinase B (PfkB)-Domäne. Diese Domäne ist in den Mitgliedern der Klasse der Ribokinasen vertreten, welche die Phosphorylierung von Ribose zu Ribose-5-Phosphat mit ATP als Donormolekül katalysieren. Das folgende Kapitel beschreibt die RNA-Expression von *CG17010*. Im Anschluss erfolgt die Durchführung der Rettungsexperimente von *bubbles*<sup>33E-m</sup> mit *CG17010*. Da eine erfolgreiche Rettung beschrieben werden konnte, erfolgt eine Neubenennung des Gennamens in *D-Rbks*<sup>33E</sup> und der bisher beschriebenen Mutante *bubbles*<sup>33E-m</sup> als Allel der Ribokinase in *D-Rbks*<sup>bubbles33E-m</sup>. Aufgrund dieser Ergebnisse schloss sich eine Sequenzierung des ORFs von *D-Rbks*<sup>33E</sup> in *D-Rbks*<sup>bubbles33E-m</sup> mit einer Identifikation einer Basendeletion an. Ebenfalls wurde eine UAS-*D-Rbks*<sup>33E</sup>-Analyse mit ausgesuchten Gal4-Treibern und ein Vergleich von Ribokinase-Proteinsequenzen anderer Organismen durchgeführt. Eine weitere für *Drosophila* spezifische Ribokinase (CG13369; *D-Rbks*<sup>1B</sup>) konnte ebenfalls für einleitende Untersuchungen hinzugezogen werden.

#### 5.6.1 *D-Rbks*<sup>33E</sup> zeigt eine embryonale RNA-Expression

Die putative PfkB-Domäne in *D-Rbks*<sup>33E</sup> lässt nicht unmittelbar auf eine Rolle in der Entwicklung des Mesoderms schließen, dennoch wurde die wildtypische Verteilung der mRNA von *D-Rbks*<sup>33E</sup> analysiert. *In situ*-Hybridisierungen zeigen eine starke mRNA-Expression von *D-Rbks*<sup>33E</sup> im zellulären Blastoderm und eine schwache ubiquitäre Verteilung während der ganzen embryonalen Entwicklung (Abb. 34, A und D). Während der Stadien 6 und 7 des einwandernden Mesoderms ist eine

stärkere Expression in dieser Region erkennbar (Abb. 34, Pfeile in B und C). Es ist auch eine Expression während Stadium 8/9 im ausgestreckten Keimstreif im Bereich des somatischen Mesoderms zu beobachten (Abb. 34, Pfeil in E). Ab Stadium 15 ist *D-Rbks*<sup>33E</sup> vor allem in Bereich des Mitteldarmes lokalisiert, wobei es sich hierbei um das viszerale Mesoderm oder auch um das Endoderm handeln könnte (Abb. 34, Pfeil in F). Dies ist durch weitere Analysen wie einer zukünftigen Durchführung einer Antikörperfärbung mit  $\alpha$ -*D-Rbks*<sup>33E</sup> noch genauer zu untersuchen. Ausgehend von diesen Ergebnissen ist also nicht auszuschließen, dass *D-Rbks*<sup>33E</sup> eine Funktion in der Entstehung der Muskulatur von *Drosophila* besitzt und deswegen werden weitere Analysen wie eine mögliche Rettung von *bubbles*<sup>33E-m</sup> durch *D-Rbks*<sup>33E</sup> angestrebt. Möglich sind parallel Untersuchungen der RNA-Expression von *D-Rbks*<sup>33E</sup> an *bubbles*<sup>33E-m</sup>-Mutanten. Darauf wurde allerdings verzichtet, da zur Zeit eine Herstellung eines Peptid-Antikörpers durchgeführt wird.

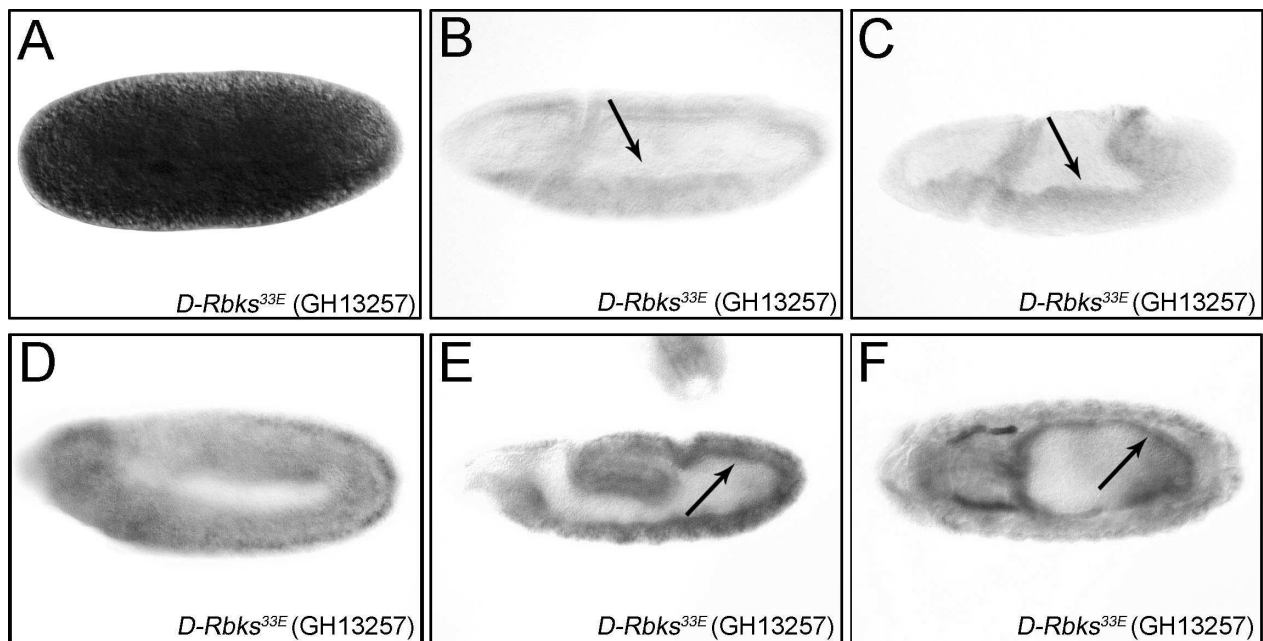


Abbildung 34: *D-Rbks*<sup>33E</sup> ist während der ganzen Embryonalentwicklung in *Drosophila* exprimiert. Die *D-Rbks*<sup>33E</sup>-mRNA ist stark im zellulären Blastoderm exprimiert (A). Die erste mRNA-Expression ist zur Zeit des einwandernden Mesoderms in Stadium 6/7 schwach detektierbar (Pfeile in B und C). Anschließend kann eine ubiquitäre Expression in Stadium 7/8 beobachtet werden (D und Pfeil in E). Ab Stadium 15 ist *D-Rbks*<sup>33E</sup> wahrscheinlich im Endoderm oder eventuell im viszeralen Mesoderm exprimiert (F). Das Signal in den Speicheldrüsen ist ein Artefakt (F).

### 5.6.2 Der somatische Phänotyp in *bubbles*<sup>33E-m</sup> wird von UAS-*D-Rbks*<sup>33E</sup> gerettet

Aufgrund der interessanten frühen mesodermalen RNA-Verteilung von *D-Rbks*<sup>33E</sup> wurde der ORF dieses Gen mit einer UAS-Sequenz und einem HA-Anhang kloniert und in Fliegen injiziert. Anschließend erfolgte eine Kreuzung des Transgens in den mutanten Hintergrund von *bubbles*<sup>33E-m</sup> und parallel eine Einkreuzung der Mutante in Gal4-Treiberlinien. Die Twist- und D-Mef2-Gal4-Treiber wurde nach der Möglichkeit ausgewählt, in allen mesodermalen Zellen bereits zu einem

frühen Zeitpunkt die Expression eines UAS-gekoppeltes Gens aktivieren zu können. Die Auswertung der Rettungskreuzung erfolgte an den Embryonen aus der Kreuzung von den beiden, oben genannten, zusammengekreuzten Stämmen mit Hilfe von  $\alpha$ - $\beta$ 3-Tubulin-Färbungen. Tatsächlich konnte eine Rettung des somatischen *bubbles*<sup>33E-m</sup>-Phänotyps gezeigt werden. Es ist eine deutliche Verbesserung des somatischen Muskelmusters zu sehen, wobei etwa zwei Drittel der analysierten Embryonen ein recht wildtypisches Muskelmuster zeigen, in dem die Defekte in der somatischen Muskulatur, wie in *bubbles*<sup>33E-m</sup>-Embryonen beschrieben, weitestgehend nicht mehr zu beobachten sind.

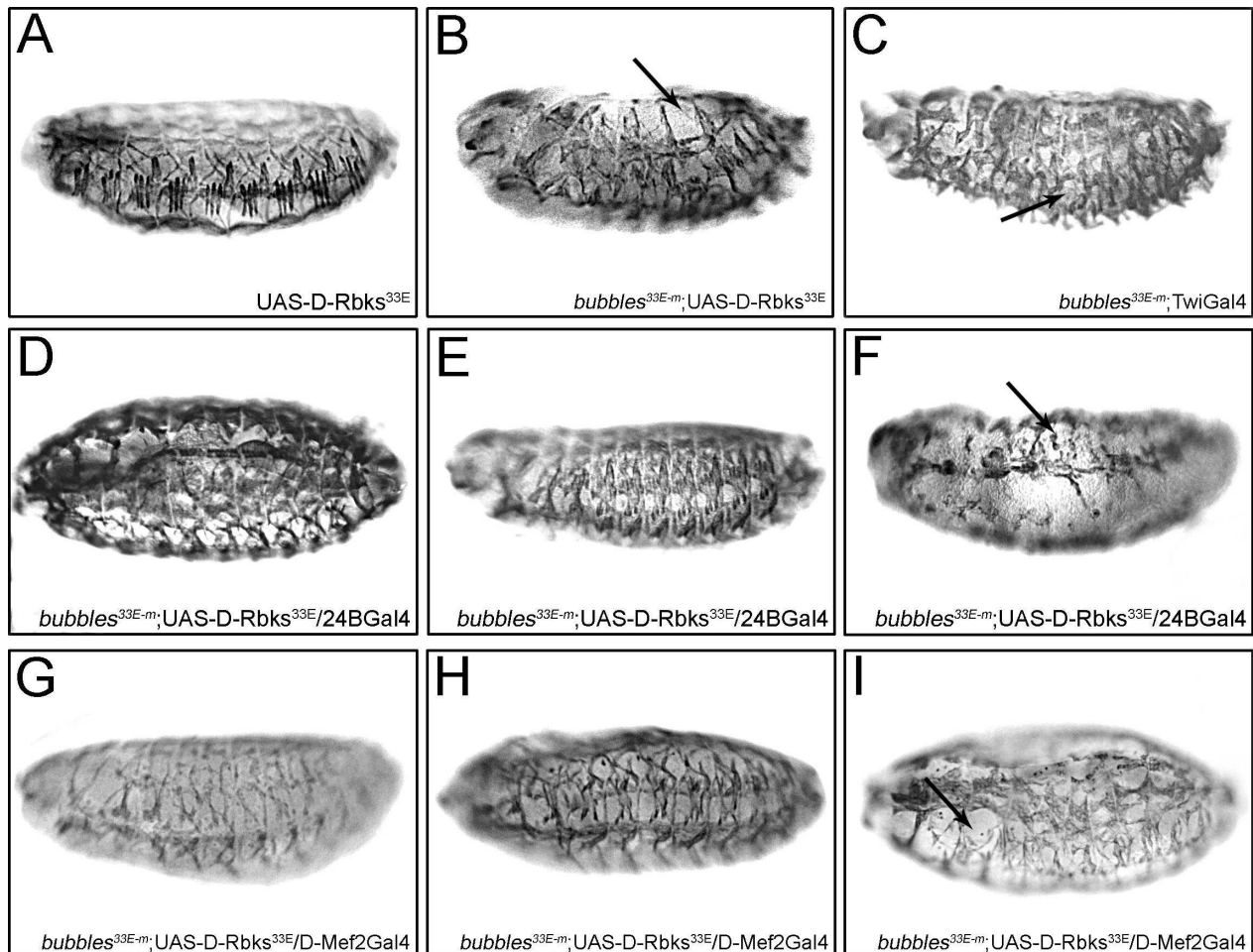


Abbildung 35: **Die mesodermale Expression durch UAS-D-Rbks<sup>33E</sup>/24BGal4 im homozygoten *bubbles*<sup>33E-m</sup>-Hintergrund rettet den somatischen Phänotyp.**

Dargestellt sind in der oberen Spalte die Embryonen der Ausgangslinie des Transgens von D-Rbks<sup>33E</sup> (A), des Transgens (B) bzw. des Treibers Twist-Gal4 im mutanten Hintergrund (C), jeweils im Stadium 15/16. UAS-D-Rbks<sup>33E</sup> wurde in den mutanten Hintergrund von *bubbles*<sup>33E-m</sup> gekreuzt und mit 24B-Gal4 bzw. D-Mef2-Gal4 getrieben (D bis F bzw. G bis I). 2/3 der ausgewerteten homozygoten Embryonen zeigten ein weitestgehend normales somatisches Muskelmuster (B, C und G) oder eine wesentliche Verbesserung der Muskulatur (D, E und H), während 1/3 der Embryonen keine eindeutige Rettung zeigte (F und I). Die Pfeile markieren die Bereiche fehlender Muskeln (F und I). Die Bezeichnung *bubbles*<sup>33E-m</sup> soll die homozygote Situation der Mutation auf dem zweiten Chromosom darstellen

In etwa ein Drittel der Embryonen war keine Verbesserung zu beobachten und diese Embryonen zeigten den bereits beschriebenen mutanten Phänotyp mit der fehlerhaften Struktur und Anheftung der Muskeln, sowie der Unterbrechungen im Muskelmuster (Abb. 35, vergleiche D und E mit F bzw. G und H mit I). Die Kreuzungen der Ribokinase-Transgene mit den Treiberlinien D-Mef2-Gal4 und Twist-Gal4 ergaben in etwa die gleichen Ergebnisse. Die Kontrollen in Form von nicht-getriebenen Transgenen (Abb. 35, A), dem Transgen (Abb. 35, B) bzw. Treiber (Abb. 35, C) im mutanten Hintergrund zeigten die erwarteten Ausprägungen. Zusammenfassend ist durch diese Ergebnisse daher anzunehmen, dass *bubbles<sup>33E-m</sup>* ein Allel der D-Rbks<sup>33E</sup> ist und deshalb erfolgt eine Umbenennung der Mutante von *bubbles<sup>33E-m</sup>* als ein Allel der Ribokinase in *D-Rbks<sup>bubbles33E-m</sup>*.

### 5.6.3 Die Sequenzierung des kodierenden Bereiches von *D-Rbks<sup>33E</sup>* zeigt eine Basendeletion in *D-Rbks<sup>bubbles33E-m</sup>*-Mutanten, was in einem verkürzten Protein resultiert

Aufgrund der Resultate der Rettungsexperimente wurde *D-Rbks<sup>33E</sup>* im mutanten Hintergrund von *D-Rbks<sup>bubbles33E-m</sup>* sequenziert. Dazu werden einzelne mutante Embryonen mit Hilfe von  $\alpha$ - $\beta$ 3-Tubulinfärbungen selektioniert und der ORF von *D-Rbks<sup>33E</sup>* mittels PCR amplifiziert. Die verwendeten Primer sind im Kapitel 3.8 aufgeführt. Als Kontrolle ist die Mutante E831 (Hummel *et al.* 1999a,b) aus dem gleichen genetischen 'Screen' verwendet worden, um eventuelle Polymorphismen zu identifizieren, welche nicht auf eine spezifische Mutation hinweisen würden. In drei unabhängigen Experimenten konnte eine Deletion eines Adenosins in Position 494 identifiziert werden (siehe schematische Darstellung in Abb. 36; Sequenzen siehe Anhang A.2). Dies führt zu einem Frameshift, welcher zu einer veränderten Aminosäuresequenz und schließlich zu einem frühen Stopp führt (Abb. 36). Dadurch konnte gezeigt werden, dass in *D-Rbks<sup>bubbles33E-m</sup>* die Ribokinase D-Rbks<sup>33E</sup> mutiert ist. Die ATP-Bindestelle ist deletiert, aber die Ribose-Bindestelle ist noch vorhanden (Abb. 36, (B) bzw. (A)).

Es gibt zur Zeit keinen *Drosophila*-spezifischen D-Rbks<sup>33E</sup>-Antikörper, aber es ist ein humaner Antikörper gewerblich verfügbar, so dass dieser Antikörper an *Drosophila*-Embryonen getestet wurde. Allerdings konnte keine spezifische Färbung erzielt werden und auch der Versuch, das Protein aus embryonalen Extrakten mit diesen Antikörper mittels Western-Blot nachzuweisen, ist nicht gelungen (Daten nicht gezeigt). Daher wird angenommen, dass der humane RBKS-Antikörper nicht spezifisch an D-Rbks<sup>33E</sup> binden kann. Aufgrund dessen wurde beschlossen, einen Peptid-Antikörper gegen D-Rbks<sup>33E</sup> herzustellen. Es boten sich aufgrund der Aminosäuresequenz von D-Rbks<sup>33E</sup> zwei Bereiche zur Immunisierung von Kaninchen an. Dabei handelt es sich einmal um eine Aminosäure-Sequenz im einzigartigen c-terminalen Bereich und um eine Sequenz im zentralen Bereich des Proteins kurz hinter der identifizierten Mutation in *D-Rbks<sup>bubbles33E-m</sup>*. Diese Peptide sind zur Zeit zur Immunisierung in Kaninchen eingesetzt.

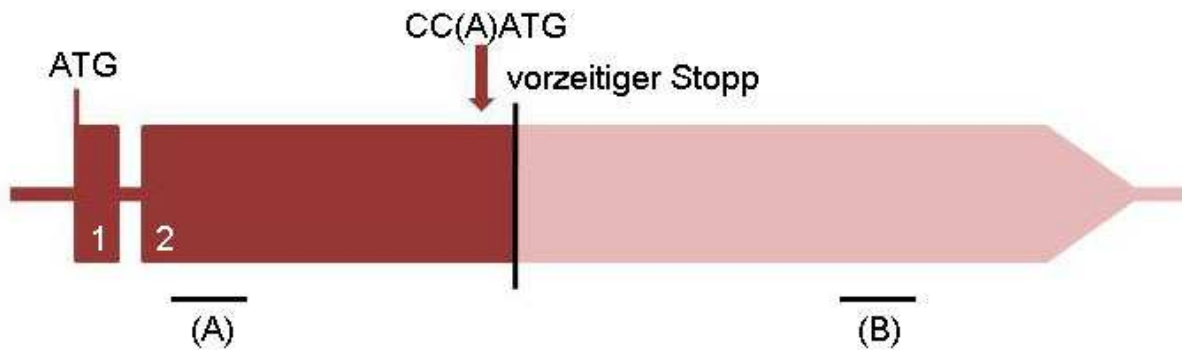


Abbildung 36: Die Sequenzierung von *D-Rbks<sup>bubbles33E-m</sup>* ergibt eine Basendeletion an **Position 494**. Die Deletion des Adenosins an Position 494 führt zu einer Rasterverschiebung im Leserahmen und folgend nach neun Aminosäuren zu einem Stopp-Codon. Deshalb wird in *D-Rbks<sup>bubbles33E-m</sup>* nur ein Fragment der Ribokinase translatiert und das Protein ist daraufhin inaktiv, da die ATP-Bindestelle (B) fehlt. Die Ribose-Bindestelle ist noch vorhanden (A).

#### 5.6.4 Die Überexpression von D-Rbks<sup>33E</sup> in allen Myoblasten-Zelltypen hat schwache somatische Defekte zur Folge

Das klonierte UAS-D-Rbks<sup>33E</sup>-Konstrukt ist mit einem HA-Anhang versehen, welcher aber, wie bereits für andere Konstrukte erwähnt, nicht spezifisch nachgewiesen werden konnte (siehe dazu Kapitel 5.5.2.1). Daher erfolgte vor der Anwendung des Konstruktes eine PCR mit spezifischen Primern für die UAS-Sequenz und mit der Gen-Sequenz von D-Rbks<sup>33E</sup>, um dessen Richtigkeit zu untersuchen. Dadurch konnte nach anschließender Sequenzierung gezeigt werden, dass sich das Konstrukt im richtigen Leserahmen mit einer korrekten UAS-Sequenz befindet und so theoretisch funktionieren kann. Die Rettungs-Experimente sprechen ebenfalls für diese Annahme.

Anschließend wurden mesodermal-spezifische Überexpressionsanalysen unter Anwendung des UAS-Gal4-Systems durchgeführt. Twist-Gal4 ermöglicht die Expression von D-Rbks<sup>33E</sup> bereits ab Stadium 7/8 in allen mesodermalen Zellen. Eine weitere verwendete Linie ist Sns-Gal4, welches eine spezifische Expression im somatischen Mesoderm erst in den fusionierenden Myotuben ab Stadium 14/15 und im viszeralem Mesoderm in den Fusionsstadien 12/13 aktiviert. Eine Überexpression von D-Rbks<sup>33E</sup> mit SNS-Gal4 führt nicht zu deutlichen Störungen in der Entwicklung der somatischen Muskulatur, obwohl wenige Embryonen leichte Unregelmäßigkeiten in der Ausbildung des somatischen Muskelmusters zeigen (Abb. 37, Pfeil in B). Die meisten Embryonen haben aber ein wildtypisches Muskelmuster. Dies kann in erster Hinsicht daran liegen, dass der FCM-spezifische Treiber die Expression des Transgens zu spät aktiviert, weshalb hier ein früheren Treiber zur Anwendung kommen sollte. Eine Überexpression von D-Rbks<sup>33E</sup> mit Twist-Gal4 führt zu leichten Veränderungen der somatischen Muskulatur.

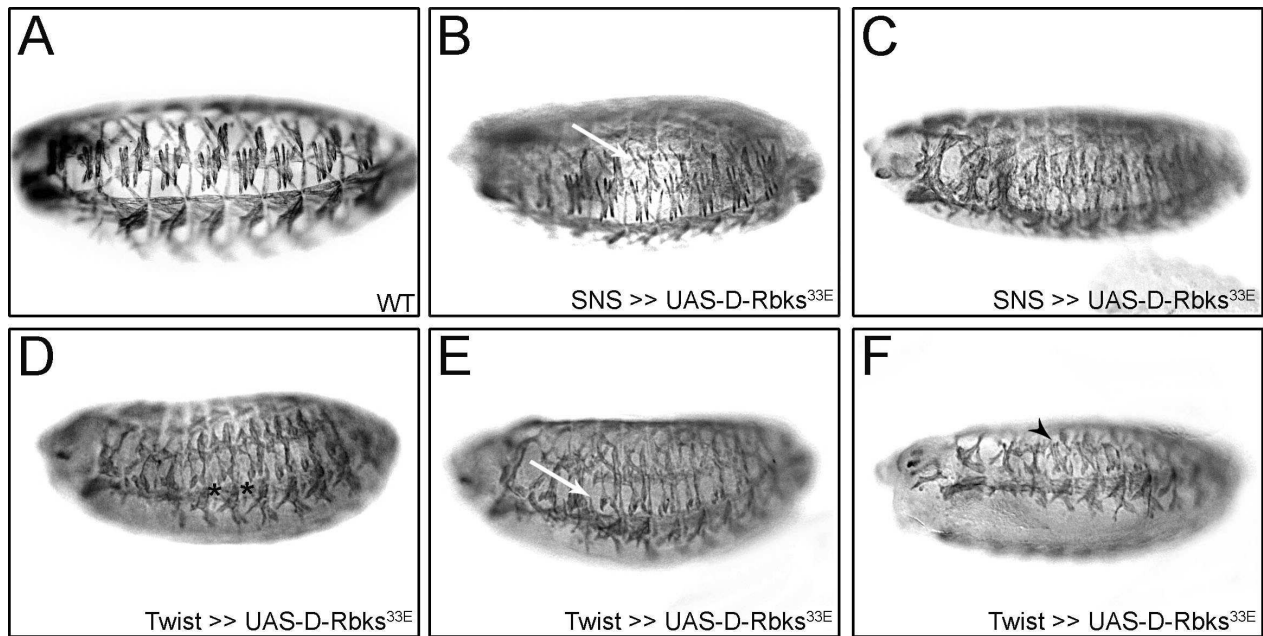


Abbildung 37: Die Überexpressionsstudien zeigen, dass D-Rbks<sup>33E</sup> eventuell in den FCs benötigt werden könnte. Eine Überexpression von D-Rbks<sup>33E</sup> in den FCMs erbrachte keine sichtbaren Veränderungen in der somatischen Muskulatur in Stadium 15/16 im Vergleich mit dem Wildtyp (vergleiche A mit B und C). Dies ist mit Vorsicht zu betrachten, da es sich hier auch um ein falsch-negatives Ergebnis bezüglich der sehr späten Aktivierung des UAS-Konstruktes durch SNS-Gal4 handeln könnte. Einige Embryonen lassen Unterbrechungen vermuten, nur konnte dies nicht durchgängig beobachtet werden (Pfeil in B). Eine Überexpression mit Twist-Gal4 in allen mesodermalen Zellen zeigte Anheftungs-Defekte (Sternchen in D) und in einigen Embryonen dünnere Muskeln und auch Unterbrechungen im Muskelmuster in Stadium 15/16 (Pfeil in E). In einigen wenigen Embryonen konnte eine Verdopplung von Muskeln beobachtet werden (Pfeilkopf in F).

An einigen Stellen scheinen Muskeln zu fehlen (Abb. 37, E), während an anderer Stelle eine Verdopplung von Muskeln stattgefunden hat (Abb. 37, Pfeilkopf in F). Ungefähr die Hälfte der Embryonen zeigen Probleme in der Anheftung der Muskeln an die Epidermis (Abb. 37, Sternchen in D). Eine Überexpression mit Twist zeigt, dass D-Rbks<sup>33E</sup> wahrscheinlich in den FCs eine Rolle spielen könnte. Daher ist es wichtig, eine Überexpression mit einem FC-spezifischen Treiber wie rP298-Gal4 durchzuführen. Es steht also zu vermuten, dass eine Überexpression von D-Rbks<sup>33E</sup> in den FCMs keine Auswirkung auf die Entwicklung der somatischen Muskulatur aufweist. Die Verifizierung, ob die D-Rbks<sup>33E</sup>-Überexpression auch im viszeralem Mesoderm zu Entwicklungsstörungen führt, bleibt zu klären.

#### 5.6.5 Der Sequenzvergleich von D-Rbks<sup>33E</sup> mit diversen Vertretern der Ribokinase-Klasse aus anderen Organismen zeigt eine hohe Übereinstimmung

Ribokinasen sind eine weit verbreitete Enzymklasse innerhalb der Pro- und Eukaryoten und ein Proteinsequenzvergleich zwischen einzelnen Vertretern dieser Gruppe soll Aufschluss über konservierte Bereiche geben. Dies ist insofern interessant, da die homologen Ribokinasen aus Bakterien

und auch Säugern bereits eingehend untersucht wurden und so mögliche Parallelen zur spezifischen Funktion von D-Rbks<sup>33E</sup> gezogen werden können. Dazu kam das Programm ClustalW 2.0.10 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) sowie die folgenden Proteinsequenzen zur Anwendung: D-Riki<sup>33E</sup> und D-Riki<sup>1B</sup> als Vertreter aus *Drosophila melanogaster* und die jeweiligen Ribokinasen aus *M. musculus* (Hausmaus, Bezeichnung: Rbks), *H. sapiens* (Mensch, RBKS), *C. elegans* (Fadenwurm, F07A11.5), *E. coli* (Bakterium, Ribokinase) und *A. thaliana* (Ackerschmalwand, AT1G17160.1).

Der Sequenzvergleich zeigt eine recht hohe Übereinstimmung der Sequenzen, wobei die Ribokinase D-Rbks<sup>33E</sup> einen spezifischen C-Terminus besitzt, welcher nicht in den hier aufgeführten Organismen vorhanden ist. Dieser C-Terminus ist ebenfalls in der cDNA zu finden, so dass es sich hier um eine tatsächlich transkribierte Sequenz handelt, auch da erst hinter diesem Bereich eine polyA-Sequenz vorhanden ist. Des weiteren fällt die hohe Anzahl von Prolinen in diesem einzigartigen Bereich auf, weshalb zur Vermutung steht, dass es sich um eine prolin-reiche Region handeln könnte, welche in der Literatur als Protein-Protein-Interaktionsbereich bezeichnet wird (Finan *et al.* 1994; Williamson 1994). Die wichtigen Domänen sind in allen Organismen größtenteils konserviert. In Abb. 38 sind die beiden wichtigen Bereiche mit einem schwarzen Balken markiert. Die Sequenz GKGANQCVAAAKL aus D-Rbks<sup>33E</sup> kodiert für die  $\alpha\beta\alpha$ -Domäne (siehe Kapitel 2.6), welche mit zwei nahe aufeinanderfolgenden Glycinen die Bindestelle für die Ribose darstellt. Der zweite Bereich mit der Sequenz PSGAGDAFMGSLAY aus D-Rbks<sup>33E</sup> kodiert für die spezifische ATP-Bindestelle. Das Aspartat (D) in dieser Sequenz ist hier die katalytische Base, während das Phenylalanin (F) den Kontakt zwischen ATP und dem Protein stabilisiert. Unterhalb der Sequenzen sind mit grauen Balken die Höhe der Übereinstimmungen zwischen den sieben Sequenzen und der jeweiligen Aminosäure dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Ribose- und ATP-Bindestellen eine gute Übereinstimmung innerhalb der Organismen zeigen (Abb. 38).

### 5.6.6 Eine weitere *Drosophila*-spezifische Ribokinase ist wahrscheinlich nicht im Embryo exprimiert

Eine Domänensuche mit der PfkB-Domäne im Proteom von *Drosophila* ergab eine weitere Ribokinase (CG13369), welche zur besseren Unterscheidung folgend bezüglich ihrer chromosomalen Position D-Rbks<sup>1B</sup> genannt wird. Eine RNA-Expression im Embryo konnte auch nach mehrmaligen Durchführungen nicht gezeigt werden, so dass hier in erster Linie davon ausgegangen werden muss, dass D-Rbks<sup>1B</sup> wahrscheinlich nicht im Embryo exprimiert wird. So kann zu diesem Zeitpunkt vermutet werden, dass D-Rbks<sup>33E</sup> die einzige embryonal-exprimierte Ribokinase ist, was Analysen wie die Proteinverteilung von spezifischen D-Rbks<sup>33E</sup>-Antikörpern erleichtert, da keine Kreuzreaktion mit D-Rbks<sup>1B</sup> im Embryo auftreten sollten.

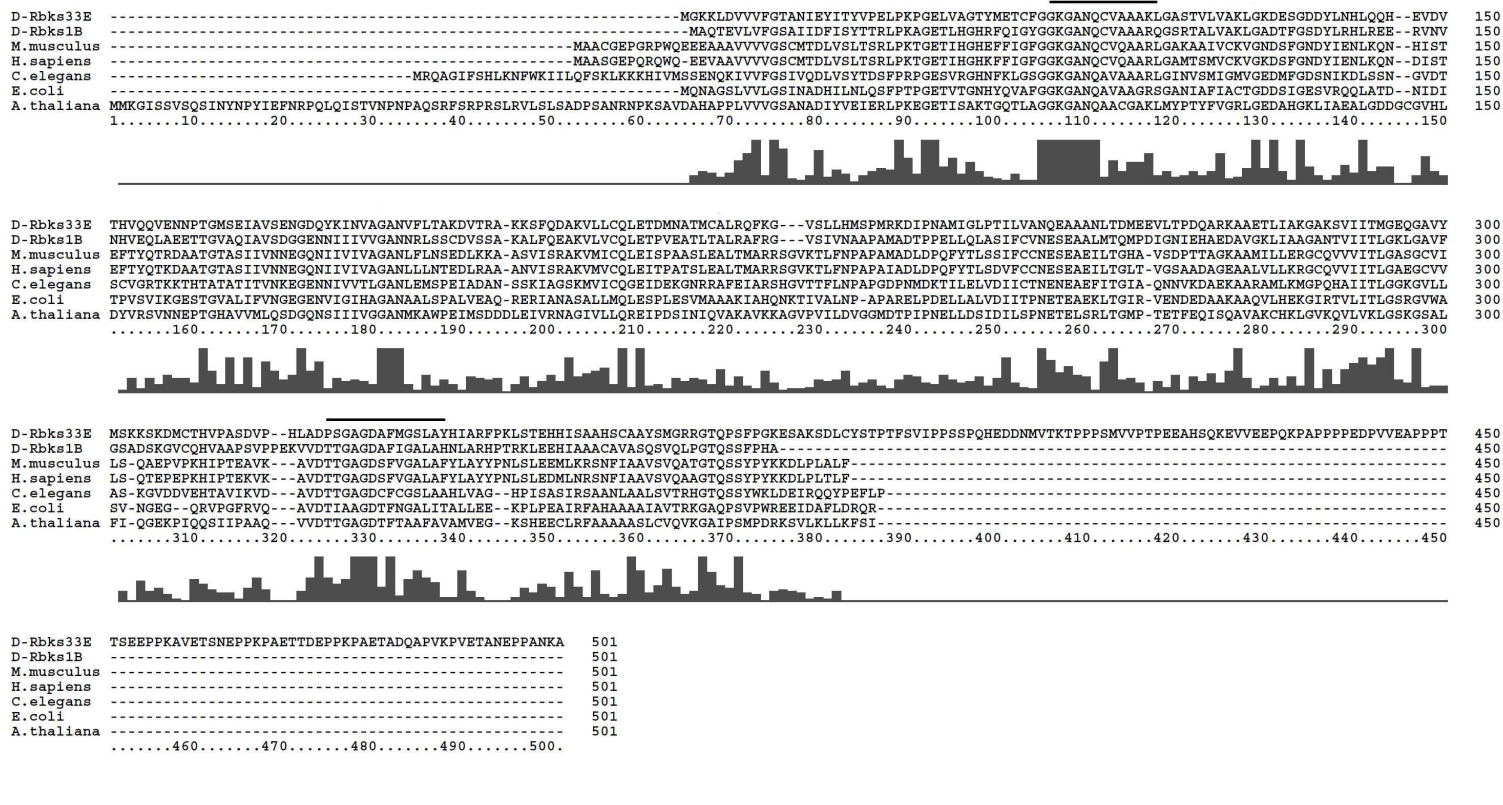


Abbildung 38: Die Homologien zwischen den Ribokinasen aus anderen Organismen und D-Rbks<sup>33E</sup> sind sehr hoch. Dargestellt sind die Sequenzen der Ribokinasen von *Drosophila* (D-Rbks<sup>33E</sup> und D-Rbks<sup>1B</sup>), *M. musculus* (Hausmaus), *H. sapiens* (Mensch), *C. elegans* (Fadenwurm), *E. coli* (Bakterium) und *A. thaliana* (Ackerschmalwand). Es zeigt sich, dass *A. thaliana* einen spezifischen N-Terminus besitzt, während D-Rbks<sup>33E</sup> einen spezifischen C-Terminus mit vielen Prolinen aufweist. Zusätzlich sind die beiden wichtigen Bindestellen mit einem schwarzen Balken markiert. Der erste Balken markiert die Ribosebindestelle und der zweite Balken die spezifische ATP-Bindestelle. Die grauen Balken unter den Sequenzen markieren in ihrer Höhe die Übereinstimmungen in der Aminosäuresequenz. Es ist gut zu erkennen, dass die beiden Bindestellen der Ribokinasen stark konserviert sind innerhalb dieser Organismen.



## 5.7 Das $\text{Ca}^{2+}$ -Bindepotein Kosh (CG10641) ist im somatischen und viszerale Mesoderm expriert

Die Lyse der Vesikel im Präfusionskomplex von *Drosophila melanogaster* bei der Fusion von FCs und FCMs ist ein wichtiger Schritt zur Bildung der elektronendichten Plaques um schließlich die Membran zu vesikulieren, damit die FCMs in die FC bzw. wachsende Myotube integrieren kann (Doberstein *et al.* 1997). Durch Analysen anderer Prozesse ist bekannt, dass die Lyse und Exozytose von Vesikeln ein durch das Signalmolekül  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierter Prozess ist (Pores-Fernando & Zweifach 2009). Bisher sind die Faktoren für diesen Prozess in *Drosophila* nicht identifiziert und es ist daher möglich, dass auch hier  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindepoteine notwendig sein können.

$\text{Ca}^{2+}$ -Bindepoteine sind charakterisiert durch eine Domäne des EF-Hand-Typs, welche  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen binden kann, um dieses dann an ihren Bestimmungsort zu transportieren oder an diesen festzuhalten (Tupling 2009; Liou *et al.* 2005). EF-Hand-Domänen-Proteine sind eine heterogene Proteingruppe mit diversen Funktionen und im humanen Genom sind ca. 240 kodierte Proteine mit EF-Hand-Domänen beschrieben (Schwaller 2009). Um einen ersten Hinweis auf mögliche Funktionen von EF-Hand-Domänen-Proteinen während der Myogenese von *Drosophila* zu bekommen, wurde die SMART-Domänen Datenbank auf diese Domäne hin untersucht und alle Proteine aus *Drosophila* herausgesucht, welche eine EF-Hand-Domäne besitzen. Es waren 73 ORFs mit mindestens einer EF-Hand-Domäne identifizierbar. 19 dieser Proteine besitzen zusätzliche prominente Domänen wie Transmembran-, Kinase oder Spektrin-Domänen, während für 54 Proteine keine weiteren Domänen vorhergesagt werden (siehe A.3).

Aufgrund der hohen Anzahl der Proteine mit EF-Hand-Domäne erfolgte eine weitere Eingrenzung möglicher Kandidaten. Diverse 'Screens' wurden bereits mit dem Ziel durchgeführt, mesoderm-spezifische Gene für *Drosophila* zu identifizieren (Furlong *et al.* 2001; Estrada *et al.* 2006). Nach der Analyse dieser Daten fanden sich in den zwei aufgeführten Veröffentlichungen Hinweise auf eine mesodermale Expression des CG10641. Furlong und Kollegen identifizierten mit CG10641 ein weiteres Ziel-Gen des mesodermalen Transkriptionsfaktors Twist (Furlong *et al.* 2001). Estrada und Kollegen beschreiben einen Genexpressionsprofil-'Array', in dem spezifische Gene und ihre Expression in FCs und FCMs untersucht wurden, um ihre Zeltypspezifität zu ermitteln. CG10641 wird als FCM-spezifisches Gen aufgeführt und erste *in situ*-Hybridisierungen zeigen eine Expression im extendierten Keimstreif, also vor der Fusion im somatischen Mesoderm (Estrada *et al.* 2006).

Daher wurde die mRNA-Verteilung von CG10641, folgend *kosh* genannt, über die gesamte Myogenese analysiert. Die bereits beschriebenen Expressionsmuster von Estrada und Kollegen konnten verifiziert und darüber hinaus eine RNA-Expression von *kosh* während fast der gesamten somatischen und viszerale Myogenese gezeigt werden. In den *in situ*-Hybridisierungen ist die mRNA im zellulären Blastoderm nicht nachweisbar (Abb. 39, A) und die RNA-Expression von *kosh* beginnt während der Einwanderung des Mesoderms in Stadium 6/7 (Abb. 39, B und C). Nach der Differenzierung ist die *kosh*-mRNA im somatischen und viszerale Mesoderm in Stadium 14/15 expriert (Abb. 39, D und E).

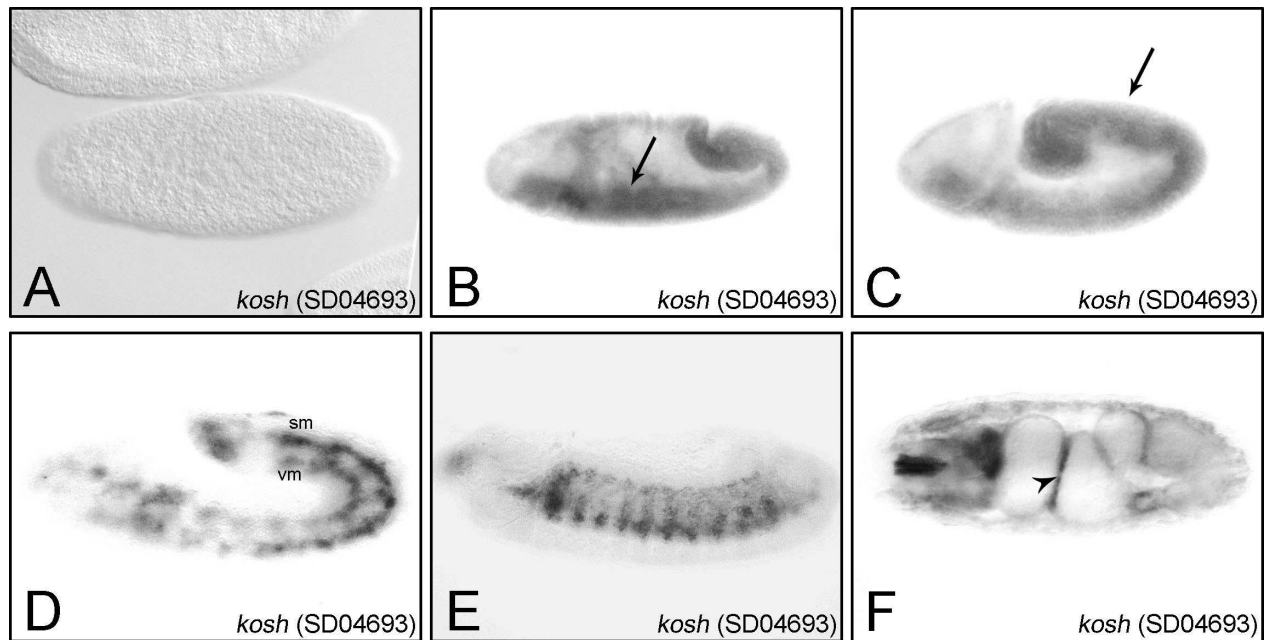


Abbildung 39: ***kosh* wird während der Myoblastenfusionsstadien exprimiert.** Im zellulären Blastoderm ist die *kosh*-mRNA nicht nachweisbar (A), und die erste zygotische Expression beginnt im Stadium 6/7 des invaginierenden Mesoderms (B und C). Später wird die mRNA von *kosh* im somatischen (sm) und viszeralem Mesoderm (vm) in den Stadien 10 bis 11 exprimiert (D). Zur Zeit der Myoblastenfusion in Stadium 14 ist die mRNA von *kosh* im repetitiven Muster des somatischen Mesoderms (E) detektierbar. Ab Stadium 16 kann die mRNA nur noch im viszeralem Mesoderm gezeigt werden (F), während die somatische Expression verschwindet.

Ab dann ist kein Transkript im somatischen Mesoderm zu beobachten, allerdings ist die *kosh*-mRNA in den Darm-Konstriktionen und dem Pharynx im Stadium 16 nachweisbar (Abb. 39, F). Da *kosh* zur Zeit der Myoblastenfusion im somatischen und viszeralem Mesoderm exprimiert ist, kann eine Funktion von *kosh* während dieses Prozesses angenommen werden. Kosh als  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindeprotein stellt daher einen interessanten Ansatzpunkt für weitere Analysen bezüglich der Regulation der somatischen und viszeralem Muskelentwicklung dar. Aufgrund dessen wird ein Peptidantikörper gegen Kosh produziert, dessen Auswertung im Rahmen einer angeschlossenen Masterarbeit erfolgen wird.

## 6 Diskussion

Signalwege, die von der Zelladhäsion der Myoblasten zur Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts führen, sind in der Myogenese von *Drosophila melanogaster* gut untersucht, trotzdem fehlen viele Faktoren, die einen vollständigen Blick auf die Prozesse der Muskelentwicklung geben. Neben der Herstellung von Mutanten mittels chemischer Mutagene wie EMS werden immer häufiger 'Arrays' angewendet, welche die sich verändernden gewebespezifischen Expressionsmengen von Genen messen und so Gen-Aktivitäten anzeigen. Durch solche 'Screens' sind Komponenten verschiedener Signalwege identifizierbar. Im Laufe dieser Arbeit ist eine EMS-induzierte Mutante charakterisiert worden, welche Defekte in der Entwicklung der larvalen somatischen Muskulatur zeigte. Das zugrunde liegende Gen konnte erfolgreich identifiziert und die Abberation in der Sequenz der Mutante gezeigt werden. Mit einer *Drosophila*-spezifischen Ribokinase wurde eine bisher noch nicht beschriebene neue Komponente in der Muskelentwicklung aufgedeckt. Zusätzlich konnte, unter Zuhilfenahmen von u. a. 'Array'-Daten, ein Myogenese-spezifisches Kalzium-Bindeprotein beschrieben werden, welches die Hypothese einer Beteiligung von Kalzium bei der Myogenese von *Drosophila* unterstützt.

Der erste Teil dieser Diskussion befasst sich mit dem durch EMS mutierten Chromosom *E832*, die Entkopplung der drei myogenese-relevanten Mutationen auf diesem EMS-Chromosom und die Auswertung der phänotypischen Analyse der drei Mutanten. Die Funktionen der Ribokinase D-Rbks<sup>33E</sup> sollen im zweiten Teil in die Abläufe der somatischen Myogenese von *Drosophila* eingefügt werden. Es folgt in dritten Teil eine Abschätzung der Relevanz des Kalzium-Bindeproteins Kosh in die Prozesse der Muskelentwicklung, bis sich schließlich im vierten Teil ein Ausblick auf zukünftige Fragestellungen bezüglich weiterführender Arbeiten anschließt.

### 6.1 Die auf dem zweiten Chromosom kartierte EMS-Mutante *E832* (P3-106/2) ist in drei Mutanten mit Defekten im somatischen sowie im viszeralem Mesoderm trennbar

Im Zuge der Auswertung eines 'Screens' (Hummel *et al.* 1999a,b) für myogenese-relevante Gene wurden bereits myogenese-relevante Allele von *kette*, *wasp* und *arp3* beschrieben (Schröter *et al.* 2004; Schäfer *et al.* 2007; Berger *et al.* 2008). Der Muskel-Phänotyp der EMS-induzierten Mutante *E832* konnte mit Hilfe diverser immunhistochemischer Nachweise beschrieben werden, und die mutanten Embryonen zeigten eine Störung in der Entwicklung der somatischen sowie der viszeralem Muskulatur. Die Muskeln sind dünner, was auf eine geringere Anzahl von Fusionen hinweist. Im Vergleich zu anderen Fusionsmutanten sind in späten Stadien weniger freie FCs zu sehen, allerdings sind ab Stadium 13/14 viele Makrophagen detektierbar, die die FCs phagozytiert haben. Die verringerte Anzahl der Zellkerne bestätigt dies. Neben diesen an dieser Stelle zusammengefassten Merkmalen treten diverse Defekte im viszeralem Mesoderm bei der Entstehung der Darmmuskulatur auf. Hier sind die Myoblastenzelltypen in ihrer Morphologie verändert und in einem Großteil der mutanten Embryonen ist das viszerale mesodermale Band nicht vollständig ausgebildet. Es kann trotz dieser scheinbaren Reduktion an Myoblasten eine viszerale Muskulatur aufgebaut werden, wobei allerdings

die typischen Einschnürungen des Darms, die Konstriktionen, gar nicht oder nur in Ansätzen gebildet werden. Die Auflistung soll an dieser Stelle verdeutlichen, dass es sich um vielseitige Defekte in der EMS-Mutante *E832* handelt, und es nun gilt, die einzelnen dafür verantwortlichen Gene zu identifizieren. Die Kenntnisse der einzelnen Mutationen, die den Phänotyp hervorrufen und die Identifikation des jeweils relevanten Gens erlaubt die Eingliederung in den Prozess der Myogenese.

Die EMS-Mutagenese ist ein häufig verwendeter Ansatz zur Herstellung von Mutanten und viele der myogenese-spezifischen Komponenten wurden mittels dieser Methode identifiziert. Es sind aber auch Grenzen dieser Methode aufzeigbar. Durch EMS mutagenisierte Chromosomen weisen häufig mehr als eine Mutation auf, meist in Form eines Basenaustausches oder einer kleinen Deletion. Dadurch müssen die generierten Mutanten mit Vorsicht analysiert werden. Eine Möglichkeit, dieses Problem zu umgehen, ist eine Bereinigung der betroffenen Chromosomen mittels Rekombinationen. Durch diesen auch als Entkopplung bezeichneten Vorgang sind zusätzliche Mutationen voneinander trennbar. Dabei ist es wichtig, die ungefähre zytologische Position der Mutationen zu kennen, um eine entsprechende Anzahl von Rekombinationskreuzungen zu planen. Liegen die beiden Loci auf zwei unterschiedlichen Chromosomenarmen, können die Kreuzungsansätze niedrig gehalten werden. Bei einer geringen räumlichen Nähe sind viele Kreuzungen durchzuführen. Dadurch ist es anschließend möglich, die Mutationen und die so resultierenden mutanten Phänotypen der Embryonen getrennt voneinander zu betrachten und auszuwerten. Nur so besteht hinterher die Handhabe, Experimente wie Rettungskreuzungen oder Überexpressionsstudien durchzuführen und die Funktion des einzelnen Gens zu analysieren.

Im Fall des *E832*-Chromosoms war mit Hilfe einer Defizienzen-gestützten Komplementationsanalyse gezeigt worden, dass sich zwei genomische Bereiche für die oben beschriebenen, mutanten Merkmale verantwortlich zeichnen, so dass eine Trennung dieser beiden Bereiche notwendig war. Da es sich hier um die Bereiche 32F2-33A1 und 33E1-33E3 handelt, ist die Rekombinationswahrscheinlichkeit gering, weil diese sehr nahe beieinanderliegen. Bei einer Anzahl von ca. 350 angesetzten Kreuzungen war die Rekombination erfolgreich, und es konnten mittels Komplementationsanalyse überraschenderweise drei Letalität-verursachende Mutationen identifiziert werden. Zur Orientierung erfolgte eine genaue Benennung dieser drei Mutanten bezüglich ihrer genomischen Position: *bubbles*<sup>33E-m</sup>, *33E-vm* und *32F-sm*. Die Abbildung 40 stellt in einer Übersicht die beiden genomischen Bereiche mit den jeweiligen dort lokalisierten Mutanten und der Situation der somatischen und viszerale FCs und FCMs dar. Darüber hinaus sind die in diesen Bereichen liegenden ORFs und hauptsächlich verwendeten Defizienzen angegeben. In den folgenden Abschnitten dieses Teils werden die mutanten Phänotypen von *32F-sm*, *bubbles*<sup>33E-m</sup> und *33E-vm* erläutert und es erfolgt die Eingliederung von *32F-sm* und *33E-vm* in den Kontext der somatischen bzw. viszerale Myogenese.

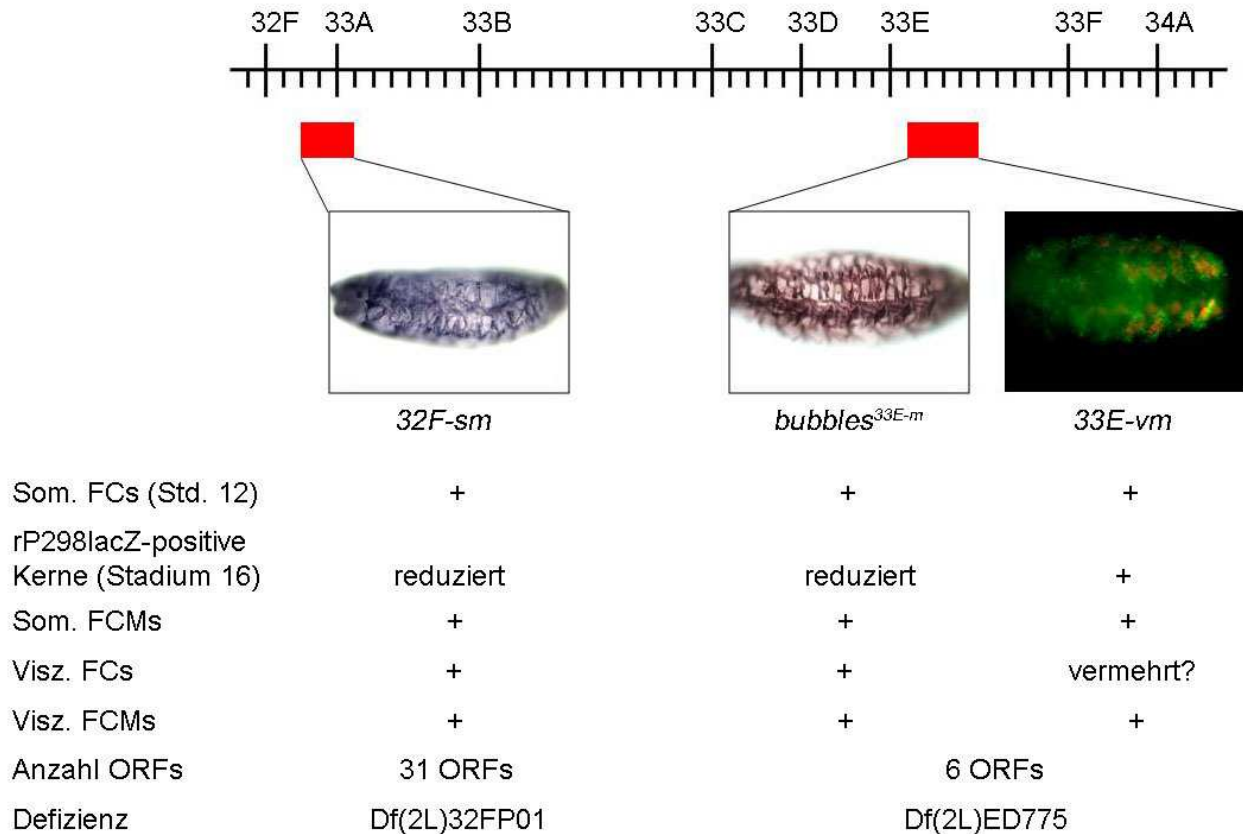


Abbildung 40: Die Übersichtsdarstellung zeigt die drei Bereiche des *E832*, in denen Myogenese-relevante Mutationen aufgedeckt wurden. Dargestellt ist das Ergebnis der genomischen Lokalisierung und die relative Lage der drei Mutationen zueinander. *32F-sm* befindet sich in dem Bereich 32F2 bis 33A1 und zeigt eine am Ende der Embryogenese verminderte Anzahl von rP298lacZ-positiven Zellkernen in Stadium 16, während die somatischen FCs zu Beginn der Fusionen in Stadium 12 und die viszerale FCs und FCMs in Stadium 9/10 normal erscheinen. In diesem Bereich sind 31 proteinkodierende ORFs postuliert und die verwendete Defizienz ist Df(2L)32FP01. *bubbles<sup>33E-m</sup>* und *33E-vm* lokalisieren in den Bereich 33E1-33E3. *bubbles<sup>33E-m</sup>* zeigt eine verminderte Anzahl der somatischen rP298lacZ-positiven Kernen in Stadium 16. In Stadium 12 sind die somatischen FCs und in Stadium 9/10 die viszerale FCs und FCMs normal determiniert. In *33E-vm* scheinen die viszerale FCs in Stadium 9/10 in einer erhöhten Zahl vorhanden zu sein. In diesem Bereich sind 6 proteinkodierende ORFs lokalisiert. Die Defizienz Df(2L)ED775 wurde hier für die meisten Experimente genutzt.

#### 6.1.1 In dem genomischen Bereich 32F2-33A1 kann bisher kein Gen definitiv für den Muskelphänotyp von *32F-sm* zugewiesen werden

**6.1.1.1 Der mutante Phänotyp von *32F-sm* kann eine fehlerhafte Fusion der FCMs mit den FCs als Ursache haben** In dem Bereich 32F2-33A1 konnte in Embryonen der Mutante *32F-sm* eine Fehlbildung der somatischen Muskulatur identifiziert werden. Nachweise mit  $\alpha$ - $\beta$ -Tubulin,  $\alpha$ -D-Mef2,  $\alpha$ -Lmd und  $\alpha$ - $\beta$ -Galaktosidase zeigen eine unstrukturierte Muskulatur und fehlende Mus-

keln. Ebenso sind weniger rP298*lacZ*-positive Kerne als im Wildtyp in Stadium 16 zu beobachten. Der nach der Entkopplung sichtbare Muskelphänotyp ist schwächer und in der Struktur etwas geordneter als in den Embryonen der homozygoten Embryonen des *E832*-Chromosoms. Die fehlerhafte Insertion von Muskeln in *E832*-Embryonen kann in *32F-sm*-Embryonen nicht beobachtet werden und auch das Fehlen von Myoblasten ist nicht so schwerwiegend. Dies verwundert nicht, wenn, ausgehend vom *E832*-Chromosom, nur noch eine der beiden identifizierten somatischen Mutationen vorhanden ist.

Wie bereits ausführlich für *bubbles*<sup>33E-m</sup> erörtert, wurde hier die Anzahl der somatischen FCs im Laufe der Myoblastenfusion beobachtet, und es konnte ebenfalls eine normale Determination der somatischen FCs zu Beginn der Fusion gezeigt werden. Eine genaue Betrachtung ergab ebenfalls, dass die Anzahl der rP298*lacZ*-positiven Zellkerne nach Beendigung der meisten Fusionen nicht der im Wildtyp entsprach. Da auch eine zuvor durchgeführte Analyse mit  $\alpha$ -Lmd eine korrekte Determination von somatischen FCMs ergab, kann eher von einem Fusionsdefekt als von einer Störung der Determination der Myoblasten in *32F-sm*-Mutanten gesprochen werden. Eine der nächsten Schritte sollte die genaue Analyse der FCs und FCMs mit spezifischen Markern wie Duf und Sns in *32F-sm* beinhalten. Eine mögliche aberrante Proteinverteilung in den Myoblasten würde hier auf eine gestörte bzw. fehlende Fusion hinweisen.

Weshalb keine unfusionierten Myoblasten zu sehen sind, ist bisher nicht zu klären. Es besteht die Möglichkeit, dass diese Zellen sehr schnell abgebaut werden und so in Antikörperfärbungen schwierig zu identifizieren sind. Ein Abbau von Zellen geht oft einher mit dem spezifischen Zelltod, der Apoptose, weshalb der Nachweis von Apoptose-Ereignissen in Embryonen von *32F-sm* zu analysieren ist. Neben Acridin-Orange als spezifischer Marker sterbender Zellen ist ein TUNEL-Test zur Visualisierung dieser Zellen über die Markierung von DNA-Strangbrüchen durchzuführen. Ist in *32F-sm* durch den Vergleich mit wildtypischen Embryonen eine erhöhte Apoptose-Rate zu beobachten, kann dies für eine mögliche Instabilität der Myoblasten sprechen.

Ein erster Versuch mit der Verwendung von Acridin-Orange, zeigten Grenzen in der Durchführung auf. Da die Embryonen sich auch nach der Behandlung mit Acridin-Orange weiterentwickeln sollen, erfolgt nur eine Entfernung des Chorions, aber nicht der Vitellinmembran. Die Embryonen wurden in einer Mischung aus Acridin-Orange und Heptan inkubiert, was zwar in einer guten Absorption des Farbstoffes resultierte, aber sich die Tatsache ergab, dass durch die freiliegende Vitellinmembran und die Anwendung von Heptan die Embryonen verklumpen, was die Analyse einzelner Embryonen erschwerte. Es ist durchaus möglich, dass die Embryonen auch ohne Vitellinmembran eine Zeit lang überleben, weshalb ein Versuch mit einer Inkubation mit Acridin-Orange ohne Vitellinmembran gestartet werden sollte. Ebenfalls könnte das Heptan als wasserunlösliche Chemikalie aus dem Versuchsablauf entfernt werden, um möglicherweise das Verklumpen der Embryonen zu verhindern. Hier muss aber die Farbstoff-Absorption in den Embryonen gewährleistet bleiben.

**6.1.1.2 Die Datenbank-gestützte Suche und die ersten Experimente ergaben keinen Hinweis auf einen putativen in der Myogenese relevanten Faktor** Die Suche nach dem

in der Mutante *32F-sm* betroffenen Gen steht nun im Vordergrund. Die Region 32F2-33A1 umfasst jedoch einen sehr großen Bereich und deshalb erfolgte eine erste Datenbank-gestützte Untersuchung der hier lokalisierten Gene. Es handelt sich um insgesamt 27 putativ proteinkodierende ORFs, welche bezüglich ihrer vorhergesagten Protein-Domänen-Struktur, der daraus geschlussfolgerten Funktion, ihrer RNA-Expressionsmuster und, falls vorhanden, der möglichen Interaktionspartner analysiert wurden. Nach dieser groben Einteilung zeigten sich viele Gene als uninteressant oder ohne hilfreiche Information. Zusammengefasst wurden die Gene *CG6488*, *CG6509*, *giac*, *kek2*, *CG6614*, *CG4983*, *CG12602*, *Tsp33* und *CG14937* für Analysen in Form von *in situ*-Hybridisierungen ins Auge gefasst. Keines der untersuchten Gene zeigte eine RNA-Expression im Mesoderm oder überhaupt im Embryo und so brachte dieser Zugang also nicht das erwünschte Ergebnis, um das in *32F-sm* betroffene Gen zu identifizieren.

Daher wurde auf die Möglichkeit zurückgegriffen, die Interaktionspartner der untersuchten Gene zu analysieren. Dabei ist auch hier Vorsicht geboten, da es sich um 'Screens' handelt und z. B. Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen oft die Gefahr von Falsch-Positiven mit sich bringen. Daher sollten diese Interaktionen bei gegebenen Anlass überprüft werden. Methoden hierzu wären Co-Immunopräzipitations-Tests, wobei zwei miteinander interagierende Proteine über einen artifiziell hinzugefügten Anhang an eines der Proteine aus einem Proteinextrakt gefiltert werden können. Der Nachweis erfolgt anschließend mit Hilfe von Western-Blots und spezifischen Antikörpern.

**6.1.1.3 Ein möglicher Kandidat in 32F2-33A1 ist CG4983, welches mit Arp1, einem Mikrotubuli-assoziierten Protein, interagiert soll** Ein globaler Hefe-Zwei-Hybrid- 'Screen' von Giot und Kollegen (2001) zeigte, dass CG4983 mit Arp1 interagiert. Dies ist isofern interessant, als dass es sich bei Arp1 um ein aktin-verwandtes Protein handelt und mit den bereits in der Myogenese benötigten Faktoren Arp2 und Arp3 zur gleichen Klasse der Aktin-Superfamilie gehört. Weitere Mitglieder dieser Familie sind u. a. die Aktine, Hitzeschock (Hsp)-/Hitzeschock-cognate (Hsc)-Proteine, diverse Zucker-Kinasen wie die Hexokinase und einige weitere ATP-Bindeproteine. Diese Proteine sind zwar in ihrer Sequenz sehr divergent, besitzen aber alle gemeinsam die ‚Aktin-Falte‘. Die ‚Aktin-Falte‘ bindet ATP in der Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Mg}^{2+}$  und katalysiert den Transfer der Phosphorylgruppe vom ATP auf eine Hydroxylgruppe von Zielmolekülen. Neben dem Prozess der Muskelkontraktion ist diese Domäne in diverse Signalwege integriert, wie der Glykolyse und der zellulären Hitzeschock-Antwort (zusammengefasst in Kabsch & Holmes 1995). Arp1 ist allerdings nicht wie die beiden verwandten Arp-Moleküle in dem Arp2/3-Komplex involviert und an dem Prozess der F-Aktin-Verzweigung beteiligt, sondern ein Bestandteil des Dynactin-Komplexes. Dieser Komplex reguliert die Dynein-basierte Bewegung von Vesikeln entlang von Mikrotubuli (zusammengefasst in Frankel & Mooseker 1996). Polymerisiertes Arp1 kann ATP in der ‚Aktin-Falte‘ binden und so die Energie unter Verwendung von  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  zur Bewegung der Vesikel liefern (Muller *et al.* 2005).

Das CG4983 zeigt darüber hinaus eine entfernte Homologie mit der Myosin-Motordomäne. Kinetische Studien zeigten, dass eine ATP-Bindung an dieser Domäne die Aktin-Myosin-Schnittstelle

durch Verringerung der Affinität auflockert, so dass durch Konformationsänderung des Myosinkopfes ATP hydrolysiert wird. Dadurch erfolgt eine erneute Bindung an Aktin, was in der typischen Muskelbewegung resultiert (Gibson *et al.* 1995). CG4983 besitzt zwar keine weiteren Domänen von konventionellen Myosinen, so dass hier nur die ATPase-Funktion wahrscheinlich ist. Allerdings ist die Übereinstimmung der Domäne von CG4983 mit der von Myosinen nicht sehr hoch, und es könnte sich um eine falsch-positive Übereinstimmung mit der Motordomäne handeln. Weiterhin waren ebenso keine überzeugenden Expressionsmuster von *CG4983* zu erhalten, was entweder auf die schwache Bindung der RNA-Sonden hinweist oder darauf, dass das Transkript ist nur in sehr geringer Menge im Embryo vorhanden. Die Ergebnisse der CG4983-RNAi-Analyse sprechen ebenfalls nicht für eine Beteiligung von CG4983 an der Myogenese. Andererseits kann das Protein von *CG4983* seine Funktion indirekt über die mögliche Interaktion mit Arp1 ausüben.

Die Bestandteile des Zytoskeletts spielen eine wichtige Rolle während der Muskelentwicklung in *Drosophila*. Während Aktin in der Fusion und der Prozesse der Muskelanheftung involviert ist, kann eine Funktion der Mikrotubuli in der Streckung der Muskeln angenommen werden (Saitoh *et al.* 1988). Diese Streckung ist abhängig von einem polarisierten Mikrotubuli-Netzwerk, wobei das 'Wachsen' der Mikrotubuli, reguliert durch Faktoren wie  $\gamma$ -Tubulin, kernnah erfolgt. Der kürzlich mittels Zellkultur-basierter Experimente identifizierte Faktor RacGAP50C wird postuliert als Regulator der korrekten  $\gamma$ -Tubulin-Anordnung an die Mikrotubuli (Guerin & Kramer 2009). Abbildung 41 zeigt eine auf Zellkultur-Experimente basierte Hypothese, wie der Dynactin-Komplex mit Arp1 in das Mikrotubuli-Netzwerk einbezogen werden kann, so dass hier ein Ansatzpunkt für weitere Überlegungen bezüglich von Arp1 in der Muskelentwicklung wahrscheinlich in der Muskelstreckung gelegt ist. Allerdings sind über Zellkultur-Analysen erhaltene Ergebnisse mit Vorsicht zu betrachten, da es sich nicht um eine *in vivo*-Situation handelt.

Durch Vesikel werden Inhaltsstoffe, sogenannte Cargos, an ihre Bestimmungsorte transportiert. Die mRNA von Arp1 ist eindeutig in späten Stadien der Entwicklung in einer kernnahe Verteilung exprimiert. In Zusammenhang mit den Ergebnissen der  $\alpha$ - $\beta$ -Tubulin-Färbung von *Arp1*<sup>1</sup>, bei dem eindeutig ein später mutanter Muskelphänotyp beobachtet wurde, kann es sich hierbei um eine Funktion von Arp1 während der Elongation oder Stabilisierung der fertigen Muskeln handeln. Das Ergebnis der *Arp1*-P-Element-Linie steht aber konträr zu dieser Annahme, da hier keine Veränderung in der Muskulatur zu beobachten ist. Deshalb sind für eine gesicherte Aussage weitere Experimente notwendig. In Schafer *et al.* wird ein spezifischer Antikörper gegen Arp1 (mAB45A) beschrieben (Schafer *et al.* 1994). Es ist daher erforderlich, eine Proteinverteilung von Arp1 im Wildtyp im Vergleich zu den beiden hier verwendeten *Arp1*-Mutanten und zur *32F-sm*-Mutante zu analysieren. Allerdings scheint die späte RNA-Expression von Arp1 nicht mit dem beschriebenen mutanten Phänotyp der *32F-sm*-Embryonen zu korrelieren, weshalb ein Zusammenhang zwischen Arp1, CG4983 und der *32F-sm*-Mutation nur schwer zu ermitteln ist.

Es konnten durch die indirekte Analyse zwar keine eindeutigen Hinweise auf die Rolle von CG4983 während der Myogenese gezeigt werden, aber es besteht die Möglichkeit, durch ein bereits vorhandenes UAS-Konstrukt eine Analyse von CG4983 bezüglich einer Funktion in der Muskulatur von



*Drosophila* durchzuführen. Falls myogenesespezifische Überexpressions- und Rettungsstudien hinreichende Hinweise geben, stellt sich nun die Frage, wie eine potentielle Funktion von CG4983 mit der Ausprägung des mutanten Phänotyps von *32F-sm*-Embryonen in Übereinstimmung zu bringen ist. Wie bereits erwähnt, kann es sich um einen Fusions- und Integritätsdefekt der Myoblasten handeln. Eine Methode, zur gezielten Untersuchung wären Doppelmutanten von *arp1*<sup>1</sup> mit *32F-sm*, um eine mögliche Verstärkung des mutanten Phänotyps zeigen zu können.

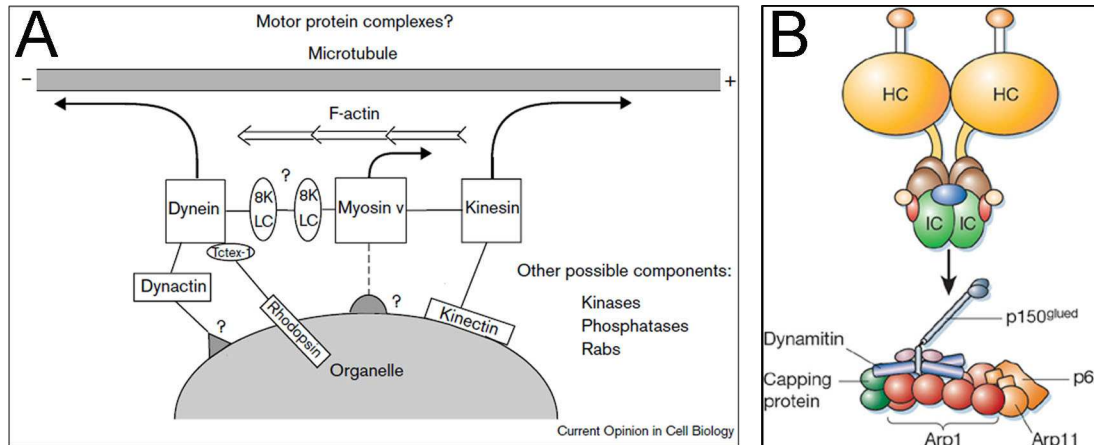


Abbildung 41: **Eine mögliche Einbindung von Arp1 über den Dynein-Dynactin-Komplex in die Abläufe Mikrotubuli-basierter Transporte.** (A) fasst die Möglichkeit von Motor-Proteinkomplex-Bildungen mit einer Kombination von Mikrotubuli-Motoren (wie z. B. Kinesin und Dynein) und Aktin-basierenden Motoren (z. B. Myosin V) und ihre Wirkung auf Mikrotubuli- bzw. F-Aktin-Netzwerke zusammen. Möglicherweise sind bestimmte Proteinkinasen und Phosphatasen ebenfalls involviert. Die Assoziation dieser Komplexe mit der Organell-Oberfläche erfolgt möglicherweise über direkte Interaktionen der Motorproteine mit Membranproteinen. Aber nicht jedes Motorprotein benötigt einen Interaktionspartner wie Dynein, wobei hier ein Interaktion mit Dynactin als Verbindung zum Organell wie z. B. dem ER angenommen wird. In (B) ist der Dynactin-Komplex (unten) mit den verschiedenen Komponenten dargestellt. Die Interaktion des Komplexes mit Dynein (oben) erfolgt zwischen der Komponente p150<sup>glued</sup> und der IC-Domäne von Dynein (Bilder entnommen aus Wu *et al.* 2000 (A) und Schliwa & Woehlke 2003 (B)).

Desweiteren könnte der Prozess der ATP-Hydrolyse in *32F-sm* gestört sein, eventuell durch eine Inaktivierung der Regulation von Arp1 durch CG4983. Diese Hypothese muss durch ATP-basierte Experimente untersucht werden. Dazu sind ATP-Inhibitoren als Zugang zu wählen. Dies ist in Fliegen nur begrenzt möglich, da dadurch auch andere ATP-abhängige Prozesse gestört werden. Anstelle dessen sind Zellkultur-Experimente denkbar, wo Inhibitoren gezielt einsetzbar sind. Bekannte ATP-Inhibitoren sind z. B. 2,4-Dinitrophenol und Natrium-Arsenat (Sarikas & Chlapowski 1986). Dabei sollte beachtet werden, dass Zellkultur-basierte Analysen nicht die *in vivo*-Situation darstellen und primäre Myblastenkulturen angewendet werden sollten. So lässt sich ein Zugang zu möglichen Funktionen der untersuchten Proteine in der Fliege finden.

Über die Analyse von CG4983 hinaus konnte gezeigt werden, dass *Arp1* und dessen putativer Interaktionspartner *Msp-300* zur fast gleichen Entwicklungszeit (Stadium 15/16) im Embryo in den

Muskeln exprimiert werden. Dies spricht für eine Kolo-kalisation, sollte aber durch Doppelfärbungen mit spezifischen Antikörpern verifiziert werden. Möglicherweise ist auch die Funktion von Msp-300, die korrekte Anheftung der Muskeln an die Epidermis (Rosenberg-Hasson *et al.* 1996), ein weiterer Hinweis auf eine gemeinsame Funktion mit Arp1 in der Regulation der Muskelstreckung. Eventuell würden Doppelmutanten aus Arp1 und Msp-300 darüber Aufschluss geben. Ein weiterer vorgeschlagener Interaktionspartner von Arp1 ist  $\beta$ -Spektrin und erste *in situ*-Hybridisierungen konnten bereits eine Expression in Stadium 16 in den Muskeln zeigen (Daten nicht aufgeführt). Zusammenfassend ist somit festzustellen, dass zwar keine direkte Beteiligung von CG4983 an der Ausprägung des mutanten Phänotyps in *32F-sm*-Embryonen möglich erscheint, aber es gibt erste Hinweise, dass Arp1 an den Prozessen der Muskelstreckung beteiligt sein könnte. Dies muss aber durch bereits aufgeführte Experimente verifiziert werden.

#### **6.1.1.4 Es ergeben sich noch weitere mögliche Kandidaten, welche sich möglicherweise für den mutanten Phänotyp in den Embryonen von *32F-sm* verantwortlich zeichnen können**

Neben CG4983 und Arp1 gibt es noch weitere Protein-Protein-Interaktionen, welche bisher allerdings nicht weiter analysiert worden sind, aber trotzdem Ansatzpunkte für die Ursache der Mutation in *32F-sm*-Embryonen liefern können. Folgend sollen daher mögliche Ideen für weitere Analysen gegeben werden. So interagieren z. B. die beiden Proteine CG6509 und Giacomo mit dem Protein Zasp52 (Z band alternatively spliced PDC-motif protein at 52). Zasp52 ist ein Regulator der Integrinfunktion, da es mit  $\beta$ -PS-Integrinen an deren Adhäsionsstellen interagiert. *zasp52*-Mutanten bilden keine Adhäsionsstellen mehr und dadurch lösen sich die bereits fertigen Muskeln wieder von der Epidermis. Darüber hinaus interagiert Zasp52 mit  $\alpha$ -Aktinin, und in *zasp52*-mutanten Larven werden keine Z-Scheiben mehr gebildet (Jani & Schöck 2007).

Giacomo ist nicht im Embryo exprimiert, was aber aufgrund der Funktion in der Spermatidenentwicklung nicht verwundert (Kracklauer *et al.* 2007). Für CG6509 konnte keine embryonale RNA-Expression gezeigt werden, so dass aus Ermangelung an Mutanten von CG6509 der Ansatz über Doppelmutanten von Zasp52 (*Zasp52* $\Delta$ ) mit *32F-sm* zu wählen wäre. Eine Verstärkung des mutanten Phänotyps von *32F-sm* könnte hier eine mögliche Interaktion zwischen Zasp52 und dem in *32F-sm* mutierten Faktors (in diesem Falle wahrscheinlich CG6509) aufzeigen. Es gibt daneben noch weitere Gene (CG4988 und CG14931), welche aufgrund fehlender cDNAs nicht für eine erste Analyse ausgewählt wurden. Sie zeichnen sich durch mögliche interessante Funktionen ihrer Interaktionspartner aus. CG4988 interagiert mit diversen Hexokinasen und wie oben schon ausgeführt, besitzen Hexokinasen eine Aktin-Falte zur ATP-Hydrolyse. CG14931 interagiert mit Thrombospondin (Tsp). Tsp ist in der extrazellulären Matrix lokalisiert und agiert als Integrin-Bindepartner, um die Muskeln an die richtigen Stellen, von der Epidermis ausgehend, zu dieser hinzuleiten. Tsp interagiert in den Tendonzellen mit  $\alpha_{PS2}$ -Integrin, um der Kraft standzuhalten, welche von den Muskelkontraktionen ausgeht (Chanana *et al.* 2007). Der erste Ansatz wäre hier die RNA-Expressionsanalyse von CG4988 und CG14931 über die Klonierung der ORFs in Vektoren, um RNA-Sonden herstellen zu können.

### 6.1.2 Der in *E832* einleitend beschriebene viszerale mesodermale Phänotyp in Form einer möglichen fehlerhaften Determination von FCs und/oder FCMs wird mutmaßlich durch einen in *33E-vm* mutierten, aber bisher noch unbekannten Faktor verursacht

Der Vergleich des viszeralen mutanten Phänotyps der Embryonen der EMS-Mutante *E832* mit den Embryonen der entkoppelten Mutanten *bubbles*<sup>33E-m</sup> und *33E-vm* zeigt, dass die beobachteten Unterbrechungen des viszeralen Mesoderms nur noch in *33E-vm* Embryonen in abgeschwächter Ausprägung zu beobachten sind. Darüber hinaus ist die Form der Myoblasten gestört, was im Vergleich mit dem Wildtyp deutlich wird, da die Unterscheidung von FCs und FCMs in *33E-vm*-Embryonen durch einen FasIII-Nachweis nicht mehr möglich ist.  $\alpha$ -Alk-Färbungen bestätigen dies. Darüber hinaus scheinen *33E-vm*-Embryonen eine vermehrte Anzahl FCs im Bereich des viszeralen Mesoderms, aber außerhalb der FasIII-positiven Zellen in Stadium 9 zu besitzen. Diese Defekte sind in *bubbles*<sup>33E-m</sup>-mutanten Embryonen nicht vorhanden.

Je nachdem, ob es sich um zirkuläre oder longitudinale viszerale FCs handelt, liegt ihr Ursprung an verschiedenen Orten im Embryo. Die zirkulären Founder sind als Band über den FCMs liegend angeordnet, während die longitudinalen FCs am posterioren Pol des Embryos entstehen. Während des Keimstreifrückzuges wandern die longitudinalen FCs in zwei Gruppen unter- und überhalb der zirkulären FCs und der FCMs zu ihrem Bestimmungsort. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die zirkulären FCs und die FCMs in einigen Bereichen nicht mehr vorhanden sind, so dass Unterbrechungen des viszeralen Bandes auftreten. Dieses Band wird gebildet aus *bagpipe* (*bap*)-exprimierenden Zell-Clustern. Durch den Jeb/Alk-vermittelten RTK-Signalweg wird eine Zellreihe zu FCs und die übrigen Zellen zu FCMs differenziert (Abb. 3, Stute *et al.* 2004). Die *bap*-Expression wird anschließend nur in den FCMs aufrechterhalten. Zwar werden die FCs und ein Großteil der FCMs in *33E-vm*-Mutanten gebildet, allerdings ist es möglich, dass die Störungen in der Ausbildung des viszeralen Bandes durch ein fehlendes Signal auftreten können. Es könnte sich unter Umständen um das Jeb-Signal aus dem somatischen Mesoderm oder ein ähnliches Signal handeln. Daher ist es in erster Hinsicht interessant, die Verteilung des Jeb-Proteins in Embryonen von *33E-vm*-Mutanten zu analysieren. Da für Bap kein Antikörper verfügbar ist, sollte ein Bap-LacZ-Promotor-Konstrukt in den mutanten Hintergrund von *33E-vm* eingekreuzt werden. Eine Analyse der Bap-Verteilung in *33E-vm* und entsprechend als Vergleich im Wildtyp sollte Aufschluss geben, wie die Situation der viszeralen FCMs und die Bildung des viszeralen Bandes zu beschreiben ist. Außerdem bietet sich die Möglichkeit zur Herstellung von Doppelmutanten mit viszeral mutantem Hintergrund. Da es sich um einen frühen Zeitpunkt der Ausprägung des Defektes handelt, in dem nach  $\alpha$ - $\beta$ -Galaktosidase- und  $\alpha$ -Alk-Nachweisen in den Embryonen zu viele viszerale FCs zu beobachten sind, stehen hier z. B. Mutanten von Alk und Notch zur Auswahl, da sie für die frühen Schritte der viszeralen FC-Determination benötigt werden. Hier sollte der Schwerpunkt auf eine mögliche Verstärkung der mutanten Phänotypen gelegt werden, was dann auf eine gegenseitige Beeinflussung bzw. eine Interaktion der untersuchten Faktoren hindeuten würde. Allerdings sind die Analysen an *33E-vm*-Embryonen mit Vorsicht zu betrachten, da immer wieder relativ wildtypisch erscheinende Embryonen auftreten. Da homo-

zygote *33E-vm*-Embryonen letal sind, stellt sich die Frage, ob es einen zusätzlichen Letalfaktor auf dem *E832*-Chromosom geben könnte, welcher durch die Entkopplung nicht rekombinatorisch von der *33E-vm*-Mutation getrennt worden ist. Daher ist es in erster Hinsicht fraglich, ob die Letalität durch den viszeralen Defekt verursacht wird. Dies kann durch eine Analyse mit einem weiteren Komplementationstest für das zweite Chromosom unter Zuhilfenahme der neuen BSC-Defizienzen nachgeprüft werden. Das ursprünglich verwendete Defizienzenkit deckt einige Bereiche auf dem zweiten Chromosom nicht hundertprozentig ab, so dass eine weitere Letal-Mutation möglicherweise bei der ersten Deletionskartierung nicht identifiziert werden könnte.

Die Beschreibung der RNA-Expression bzw. Proteinverteilung der in 33E1-33E3 kartierten Gene bzw. Proteine sprechen bisher nicht für eine mögliche Beteiligung an Prozessen zur Entwicklung der viszeralen Muskulatur. Die mRNAs von *CG31763*, *CG31862* und *Bruno-2* und das Protein von *Pkd2* sind spezifisch in anderen Geweben exprimiert und *D-Rbks*<sup>33E</sup> scheint nach der RNA-Expression und den Rettungsexperimenten ebenfalls nicht für diesen mutanten Phänotyp in Frage zu kommen. Es stellt sich nun die Frage, welcher Ansatz für weitere Analysen gewählt werden soll. Aus Ermangelung an weiteren Kandidaten sollten die bereits vorhandenen UAS-Konstrukte von z. B. *Bruno-2*, *Pkd2*, *CG31763* und *CG31862* für ein Rettungsexperiment mit spezifischen Treibern des viszeralen Mesoderms genutzt werden, um möglicherweise erste Aufschlüsse über den in *33E-vm*-mutanten betroffenen Faktor zu bekommen.

### 6.1.3 Wahrscheinlich zeigen *bubbles*<sup>33E-m</sup>-Mutanten keinen Determinations-, sondern einen Fusionsdefekt

Viele myogenesespezifische Mutanten lassen sich in Gruppen bezüglich ihres mutanten Phänotyps einteilen. So gibt es z. B. die klassischen Fusionsmutanten wie *rolling pebbles* und *sns*, charakterisiert durch eine erhöhte Anzahl von unfusionierten Myoblasten in Stadium 16/17 und der daraus resultierenden Veränderungen im Muskelmuster, und die Klasse der Determinationsmutanten wie *lmd*, welche eine fehlerhafte Determination der FCMs zeigen. Beim Fehlen von FCs können bestimmte Muskeln nicht gebildet werden können bzw. bei der Abwesenheit von FCMs keine Muskeln oder nur sogenannte 'Mini-Muskeln' entstehen.

Bei dem Versuch, *bubbles*<sup>33E-m</sup> hier einzugliedern, stößt man auf offene Fragen, da die Charakteristika dieser Mutante in erster Hinsicht nicht eindeutig einer Gruppe zuzuordnen sind. Da einzelne Muskeln nicht vorhanden sind, was vornehmlich in Löchern in der Muskulatur resultiert, wurde zu Beginn angenommen, dass es sich hier um ein Defekt in der Determination handelt. Da nicht in jedem Embryo die gleichen Muskeln fehlten, könnte der Defekt in der asymmetrischen Zellteilung oder der lateralen Inhibition liegen. Während der asymmetrischen Zellteilung werden Zellidentitäten über die selektive Verteilung von Proteinen an die beiden Tochterzellen ausgewählt. Ist dieser Vorgang fehlerhaft, kann die Zellteilungsebene nicht korrekt gebildet werden, was in andere Muskeltypen resultiert. Allerdings kann nicht mit Bestimmtheit gesagt werden, dass eine Verdopplung von bestimmten Muskeln in *bubbles*<sup>33E-m</sup> auftritt, da hier die Struktur der Muskulatur ebenfalls gestört ist, und so die Muskeln nicht eindeutig zuzuordnen sind. Dies lässt sich z. B. durch Antikör-

perfärbungen mit Muskel-Identitätsfaktoren wie Eve und Krüppel nachweisen, um bestimmte FCs zu identifizieren. In der vorangegangenen Diplomarbeit konnte mit einer  $\alpha$ -Krüppel-Färbung gezeigt werden, dass in Embryonen der EMS-Mutanten *E832* nicht immer die gleichen FCs fehlen, was auf einen fehlerhaften Mechanismus in der Determination auf der Ebene der lateralen Inhibition oder der asymmetrischen Zellteilung hinweist (Wierach 2005). Diese Analyse steht für *bubbles*<sup>33E-m</sup> noch aus, da hier die Nutzung eines Krüppel-Antikörpers nicht mehr möglich war. Erste Analysen mit einem entsprechenden Marker (Eve und Runt) zeigen keine auswertbaren Ergebnisse. Dies sollte eine Aufgabe der nächsten Experimente sein. Zusätzlich sind Nachweise von typischen beteiligten Faktoren in der asymmetrischen Zellteilung notwendig. Hier konnten erste Experimente mit  $\alpha$ -Numb (Nb) und  $\alpha$ -Sanpodo (Spdo) durchgeführt werden. Numb assoziiert mit Spdo, so dass Spdo an die Membran lokalisiert wird, wodurch der Notch-Signalweg inhibiert und so verschiedene FC-Schicksale aktiviert werden (O'Connor-Giles und Skeath, 2003). Allerdings kann an dieser Stelle ebenfalls keine Aussage über die Proteinverteilung von Spdo getroffen werden, da die Spdo-positiven mesodermalen Zellen aufgrund der starken Expression im PNS und ZNS nicht eindeutig identifizierbar sind. Das Gleiche gilt für  $\alpha$ -Numb-Färbungen. Dies bedarf weiterer Analysen in Form von Doppelfärbungen von Nb bzw. Spdo mit rP298*lacZ*, um die Myoblasten zu markieren.

Es ist an dieser Stelle daher nicht auszuschließen, dass ein Defekt der Determination in den Embryonen der *bubbles*<sup>33E-m</sup>-Mutante vorliegt, aber die normale Verteilung von FCs in den Embryonen in Stadium 12/13 sprechen nicht für einen Defekt auf diesem Level der Muskelentwicklung. Die Alternative eines Defekt auf der Stufe der lateralen Inhibition, ist ebenfalls aus den gleichen Gründen unwahrscheinlich, soll aber kurz angesprochen werden. Dieser Schritt in der Entstehung der somatischen Muskulatur liegt zeitlich vor der asymmetrischen Zellteilung und beschränkt die Expression des proneuralen Gens *lethal of scute* in den Äquivalenzgruppen auf eine Zelle, folgend Progenitor genannt. Zentrale Faktoren in diesem Vorgang sind Notch und Delta. Der Progenitor ist die Vorläuferzelle zu zwei FCs oder zu einem FC und einer Vorläuferzelle der adulten abdominalen Muskulatur, während die restlichen Zellen der Äquivalenzgruppe zu FCMs spezialisiert werden. Daher sollte die Expression von Notch und Delta in *bubbles*<sup>33E-m</sup>-Embryonen untersucht werden.

Analysen zeigten, dass die rP298*lacZ*-positiven FCs zu Beginn der Fusion in Stadium 12/13 in *bubbles*<sup>33E-m</sup>-Embryonen wildtypisch erscheinen. Im Wildtyp nehmen die durch Fusion in die FCs integrierten Kerne der FCMs die gleichen Eigenschaften an wie die bereits in den wachsenden Myotuben vorhandenen Zellkerne an und sind auch als rP298*lacZ*-positive Kerne sichtbar. Ab dem Stadium 15/16 wird ersichtlich, dass sich in *bubbles*<sup>33E-m</sup>-Embryonen die Zahl der rP298*lacZ*-positiven Kerne vom Wildtyp unterscheidet. Es sind weit weniger Kerne vorhanden, was dafür spricht, einen Fusionsphänotyp in dieser Mutante vorliegen zu haben. Was darüber hinaus auffällt, ist das Fehlen einer erhöhten Anzahl unfusionierter Myoblasten wie sie in Fusionsmutanten häufig zu beobachten ist. Dies zeigt an, dass es sich bei *bubbles*<sup>33E-m</sup> nicht um eine klassische Fusionsmutante handelt, obwohl es sehr wahrscheinlich ist, dass es sich hier um einen Defekt während der Fusion der somatischen FCs mit den FCMs handelt. Der beobachtete mutante Phänotyp in den Embryonen der EMS-Mutante *E832* und die verringerte Anzahl von Krüppel-positiven FCs zu Beginn der Fusion

resultiert wahrscheinlich daher, dass dort mehr Mutationen auf dem EMS-Chromosom *E832* lokalisiert sind, die sich gegenseitig verstärken. Daher war die bereits beschriebene Entkopplung ein sehr wichtiger Schritt gewesen, um den mutanten Phänotyp von *bubbles*<sup>33E-m</sup> spezifisch charakterisieren zu können.

#### **6.1.4 In *bubbles*<sup>33E-m</sup> besteht vermutlich ein Defekt in der Integrität der Myoblasten, weil keine Fusionen stattfinden und die Zellen anschließend von Makrophagen entfernt werden**

Neben den oben beschriebenen Charakteristika erscheint eine erhöhte Anzahl  $\beta$ 3-Tubulin-negativer Zellen, welche aufgrund ihrer Morphologie und ihres Verhaltens wahrscheinlich FCMs sind, besonders interessant. Weshalb hier keine  $\beta$ 3-Tubulin-Expression zu beobachten ist, sollte weiter untersucht werden, da es sich hier um einen Defekt in den Signalwegen der FCMs handeln könnte. Dadurch könnte tatsächlich ein Fehler in der Adhäsion zwischen FCs und den FCMs auftreten, wodurch die Integrität der FCMs nicht mehr gewährleistet ist. Darüber hinaus ist die gegenteilige Annahme möglich, wenn die FCs keine Partner zur Fusion finden, dass diese ihre Integrität verlieren und von Makrophagen entfernt werden. Beide Hypothesen führen anschließend zu einer Verringerung rP298*lacZ*-positiver Zellen in Stadium 16. Aufgrund dieser Annahme stehen zur Zeit Analysen elektronenmikroskopischer Aufnahmen und die Proteinverteilung von Duf/Kirre und SNS in *bubbles*<sup>33E-m</sup> an, wodurch diese Hypothese untersucht werden kann. Erste Ergebnisse bezüglich einer Duf/Kirre-Expression zeigen, dass eine Adhäsion von FCs und FCMs stattfindet und daher wahrscheinlich auch Fusionen durchgeführt werden, doch ist zu diesem Zeitpunkt nicht genau bestimmbar, ob es sich um eine verminderte Zahl von Fusionen handelt. Dies sollte weiter vertieft werden.

Dieser postulierte Prozess setzt die Degeneration und eine anschließende Apoptose der Myoblasten voraus. Daher wäre es interessant, zu überprüfen, ob *bubbles*<sup>33E-m</sup>-Mutanten eine erhöhte Anzahl von sterbenden bzw. toten Zellen aufweisen. Die Methode wurde bereits beschrieben (Kapitel 6.1.1). Dies würde im Ansatz die beobachteten mutanten Phänotypen wie die fehlenden und dünnen Muskeln erklären. Die Beobachtung der fehlerhaften Anheftung der fertigen Muskeln kann dadurch nicht erklärt werden, aber es kann sich hier auch, durch die fehlerhafte Fusion, um einen sekundären Effekt handeln.

#### **6.1.5 In der genomischen Region 33E1-33E3 sind Gene mit einer Expression in anderen Geweben als der Muskulatur lokalisiert**

Neben D-Rbks<sup>33E</sup> konnten weitere putativ Protein-kodierende Gene aus dem Bereich 33E1-33E3 untersucht und interessante Expressionsmuster erhalten werden. Da diese RNA- bzw. Protein-Expressionen keine Hinweise auf eine Expression im Mesoderm ergaben, wird hier auf eine ausführliche Diskussion verzichtet und es folgt nur eine kurze Zusammenfassung unter anderem anhand der folgenden Tabelle. Es werden die molekularen Funktionen, falls bekannt, angegeben und schließlich eine mögliche Eingliederung in einen Entwicklungs-Prozess, postuliert durch die hier aufgeführten

Expressionsmuster. Weiter sind die Molekulargewichte (MG) und der pI (isoelektrischer Punkt) angegeben. Es folgt die embryonale Expression in Folge der Analyse von *in situ*-Hybridisierungen und, im Fall von Pkd2, von Antikörperfärbungen sowie die dazugehörigen Beispiel-Bilder. Die folgenden zwei Zeilen beziehen sich auf die Analyse bezüglich *bubbles*<sup>33E-m</sup> und hier speziell die Sequenzierung der jeweiligen ORFs im mutanten Hintergrund und die Fähigkeit von UAS-Konstrukten, den Muskel-Phänotyp zu retten. Schließlich sind die Kapitel angegeben, in denen diese Gene genauer behandelt werden.


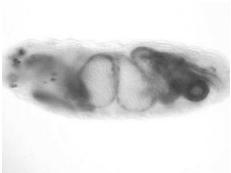

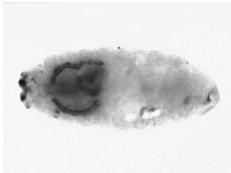

Das *CG31862* ist ein Tracheen-spezifisch exprimiertes Gen und zeigt eine sehr späte Expression im Stadium 16. Daraus entsteht die Überlegung, dass es sich hierbei um einen physiologischen Faktor handeln könnte, der nicht an der embryonalen Entwicklung der Tracheen beteiligt ist. Bis auf ein Signalpeptid sind keine Domänen durch die Sequenz kodiert. Mit Hilfe einer Deletionsmutante, welche diese Signalpeptid-Sequenz nicht mehr besitzt, wären erste spezifische Hinweise auf eine Funktion von *CG31862* in der Tracheenentwicklung möglich. Da es sich um ein kleines Peptid handelt, könnte es sicher Signalfunktion besitzen. Ebenfalls für ein kleines Protein kodiert *CG31763*, dessen mRNA zusammen mit dem Pkd2-Protein unter anderem in den Garlandzellen exprimiert ist. Es könnte sich ebenfalls um ein Protein mit Signalfunktion handeln, aber es sind, nach Abgleich mit Protein-Domänen-Datenbanken, keine Domänen vorhergesagt. Es konnte gezeigt werden, dass eine Deletion dieses Gens zum Verlust der Garlandzellen führt. Folglich ist mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers von *CG31763* die Expression genauer zu untersuchen und auch eine Analyse in Mutanten anzustreben, welche ebenfalls in die Garland-Zell-Entwicklung involviert sind. Hier bieten sich *sns*- und *duf/kirre*-Mutanten an, dessen Funktion in diesem Zelltyp bereits beschrieben wurde (Zhuang *et al.* 2009). Ähnliche Analysen sind mit Pkd2 durchzuführen. Darüber hinaus sollten Doppelmutanten von *CG31763* und Pkd2 weiterhin Aufschluss geben, inwiefern diese beiden auf dem Chromosom benachbarten Gene gemeinsam in den Prozess der Garlandzell-Entwicklung involviert sind.

Die eindeutig spezifische RNA-Expression des RNA-Bindeprotein-kodierenden Gens Bruno-2 macht weitere Analysen dieses Gens im Zuge einer Regulation von spezifischen RNAs in der Entwicklung des Endoderms und der Malpighischen Gefäße interessant und hier sollten ebenfalls  $\alpha$ -Bruno-2-Nachweise in ausgewählten Endoderm-Mutanten weitere Hinweise auf die genaue Funktion von Bruno-2 geben.

## **6.2 Die Ribokinase D-Rbks<sup>33E</sup> ist in *bubbles*<sup>33E-m</sup> mutiert und unterstützt die Relevanz von ATP-abhängigen Faktoren für die Myoblastenfusion**

### **6.2.1 Die RNA-Expression von D-Rbks<sup>33E</sup> lässt darauf schließen, dass es sich hierbei neben der muskelspezifischen Relevanz um ein ubiquitär exprimiertes Molekül handelt**

Das *CG17010* wurde infolge der Ergebnisse umbenannt in D-Rbks<sup>33E</sup>, da es sich bei diesem Protein um eine Ribokinase mit der für diese Klasse typischen PfkB-Domäne handelt. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass ein UAS-Konstrukt mit dem gesamten ORF der *D-Rbks*<sup>33E</sup> in der Lage

	CG31862	Bruno2	CG17010	CG31763	Pkd2
Molekulare Funktion (postulierte Funktion nach Expressionsmuster)	unbekannt (Tracheenentwicklung?)	RNA-Bindeprotein (Endoderm-, Malpighi- Entwicklung?)	Ribokinase (Muskelentwicklung?)	unbekannt (Garlandzell- Entwicklung?)	Ionenkanal (Garlandzell- Entwicklung?)
MG, pI	20 kDa, pI 5,4	65-91 kDa (4 Isoformen), pI 9	46 kDa, pI 4,93	14 kDa, pI 9	104 kDa, pI 8,51
embryonale Expression (RNA oder Protein)	Tracheen	Endoderm, Malpighische Gefäße	Invaginierendes Mesoderm, ubiquitär	Speicheldrüsen, Garlandzellen, Hinterdarm	Garlandzellen, Hinterdarm
					
Mutation in <i>bubbles</i> <sup>33E-m</sup>	keine	nicht getestet	Basendeletion an Position 494	keine	nicht getestet
Rettung mit Twist-GAL4 (mesodermal)	nein	nicht getestet	ja	nein	nicht getestet
siehe Kapitel	5.5.2.1	5.5.2.2	5.6	5.5.2.3	5.5.2.4



ist, den mutanten Muskel-Phänotyp von *bubbles*<sup>33E-m</sup> zu retten. Ebenfalls konnte in *bubbles*<sup>33E-m</sup> die Mutation im ORF von D-Rbks<sup>33E</sup> mit einer Basendeletion identifiziert werden. Daher erfolgte eine weitere Umbenennung der Mutante *bubbles*<sup>33E-m</sup> als ein neu identifiziertes Allel von D-Rbks<sup>33E</sup> in *D-Rbks*<sup>bubbles33E-m</sup>.

Diese in *Drosophila* noch nicht definierte Gruppe von Molekülen wurde bisher nicht im Kontext der Entwicklung der Muskulatur beschrieben, was nicht ungewöhnlich ist, da es sich hier hauptsächlich um sogenannte ‚Housekeeping‘-Proteine handelt, welche sich für den Energiehaushalt des Organismus notwendig zeichnet. Die spezifische Funktion von D-Rbks<sup>33E</sup> in der Myogenese lässt sich im ersten Blick auch nicht anhand der RNA-Expression ableiten. Neben einer maternalen Komponente ist die Expression in den Stadien des einwandernden Mesoderms zwar in diesem Bereich stärker exprimiert, aber ab Stadium 11 kann eher von einer mehr oder weniger ubiquitären Verteilung der RNA gesprochen werden. Aufgrund dessen wurden auch andere Gewebe wie die Kutikula und die Entwicklung des Nervensystems und des Herzens mit Kutikula-Präparaten bzw. Antikörpernachweisen untersucht, aber es konnte keine Veränderung dieser Gewebe in *D-Rbks*<sup>bubbles33E-m</sup> im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Dies spricht für eine spezifische Funktion von D-Rbks<sup>33E</sup> im somatischen Mesoderm, obwohl weitere Gewebe wie z. B. Endoderm und Tracheen speziell untersucht werden müssen, um dies zu bestätigen.

Eine Analyse der RNA-Verteilung der zweiten, in *Drosophila* vorhandene Ribokinase, D-Rbks<sup>1B</sup> ergab keine Hinweise auf eine Expression im Embryo, obwohl hier zur Absicherung noch zusätzliche Experimente wie eine RT-PCR durchgeführt werden müssen, um zu bestimmen, ob die RNA dieser Ribokinase im Embryo vorhanden ist. Daher kann an dieser Stelle noch nicht ausgeschlossen werden, ob D-Rbks<sup>1B</sup> eventuell in anderen Geweben des Embryos eine Aufgabe bei der Phosphorylierung von Zuckern spielen.

## 6.2.2 Die Rettung des mutanten Phänotyps zeigt eindeutig, dass D-Rbks<sup>33E</sup> in den Muskeln benötigt wird

Bei der Durchführung von Rettungskreuzungen konnte in ca.  $1/2$  bis  $2/3$  der analysierten mutanten Embryonen der *D-Rbks*<sup>bubbles33E-m</sup>-Mutante eine wesentliche Verbesserung des somatischen Muskel-Phänotyps beobachtet werden. Die Kreuzungen wurde durchgeführt mit mesodermalen Treibern wie Twist- sowie D-Mef2-Gal4 und erbrachten vergleichbare Ergebnisse.

Parallel durchgeführte Überexpressionskreuzungen lieferte hierfür erste Hinweise, da die Aktivierung durch Twist-Gal4 eine leichte Störung der Embryonen zeigte, während eine Überexpression mit SNS-Gal4 keine sichtbaren Defekte in den Embryonen zeigte. Dabei ist allerdings zu beachten, zu welchen Zeitpunkten die ausgewählten Treiber die Expression des UAS-gekoppelten Gens aktivieren. Geschieht dies zu spät, kann das zu falsch-negativen Ergebnissen führen. Daher wurden die Gal4-Linien mit UAS-*lacZ* auf ihre Aktivierungszeitpunkte untersucht und es konnte gezeigt werden, dass SNS-Gal4 im somatischen Mesoderm erst zum Zeitpunkt bereits fortgeschrittener Fusionen ab Stadium 14/15 aktiv ist (Daten nicht gezeigt). Wenn angenommen wird, dass D-Rbks<sup>33E</sup> schon

während der ersten Fusionen aktiv ist, macht dies eine Aussage bezüglich eines Überexpressionsphänotyps mit SNS-Gal4 schwierig, und es sollte auf andere FCM-spezifische Gal4-Linien zurückgegriffen werden. Hier bietet sich die Nutzung eines vor kurzen veröffentlichten FCM-spezifischen Treibers an, dessen die Expression bereits zu Beginn der Fusionen ab Stadium 12 nachweisbar ist (Beckett *et al.* 2008). Die Nutzung eines FC-spezifischen Treibers stellt sich dagegen als schwierig heraus, da die Embryonen des homozygoten rP298-Gal4-Treibers bereits selbst somatische Muskeldefekte verursacht und so die Auswertung hinsichtlich einer Überexpression von D-Rbks<sup>33E</sup> zusätzlich erschwert. Daher ist an dieser Stelle keine Aussage darüber zu treffen, ob D-Rbks<sup>33E</sup> nur in den FCs oder nur in den FCMs oder möglicherweise in beiden Zelltypen benötigt wird. Dies kann durch die Analyse der Proteinexpression von D-Rbks<sup>33E</sup> mit dem bereits in Auftrag gegebenen Antikörper in Zukunft gezeigt werden.

Interessanterweise scheint bei den Rettungsexperimente ein „Alles-oder-nichts“-Prinzip aufzutreten, da die Embryonen entweder eine fast vollständige Wiederherstellung des wildtypischen Muskelmusters zeigen oder den ursprünglichen mutanten Phänotypen von *D-rbks<sup>bubbles33E-m</sup>*. Dies ist ungewöhnlich, da üblicherweise in Rettungskreuzungen eine partielle Rettung des mutanten Phänotyps in den Embryonen vorzukommen scheint. In der ersten Überlegung würde dies bedeuten, dass die D-Rbks<sup>33E</sup> zu einem zeitlich sehr eng liegenden Punkt aktiv ist und darüber hinaus keine Rettung mehr stattfindet, so dass ein Teil der Embryonen den ursprünglichen mutanten Phänotyp zeigt, der andere Teil der geretteten Embryonen D-Rbks<sup>33E</sup> zum richtigen Zeitpunkt erhalten hat und dadurch die Muskulatur wildtypisch ist.

### **6.2.3 Die Basendeletion in *D-Rbks<sup>bubbles33E-m</sup>* führt zur Inaktivierung des Proteins und dadurch zu einer Null-Mutante, welche nicht mehr in der Lage ist, ATP zu hydrolysieren**

Die Sequenzierung des mutierten Alleles ergab eine Basendeletion an der Position 494, wodurch die Aminosäuresequenz nach 143 AS verändert wird und nach der Mutation noch neun Aminosäuren (PCGLIFQMP) bis zu einem Stopp folgen. Dadurch wird das Protein unfunktionell, da sich C-terminal die ATP-Bindestelle mit der katalytischen Base befindet und mit diesem verkürzten Protein keine ATP-Hydrolyse mehr stattfinden kann. Da die Hydrolyse normalerweise die Energie und mit ADP und der aktivierten Ribose-5-Phosphat die Substrate für weitere Reaktionen liefert, kann hier von einer Null-Mutante gesprochen werden.

Die in der Einleitung erwähnte Sequenz des NXXE-Motivs ist in *Drosophila*, im Gegensatz zu den beiden anderen wichtigen Motiven der Substrat- und ATP-Bindung, nicht konserviert. Hier ist die Aminosäure-Abfolge NQEA vorhanden. Die zweite Ribokinase D-Rbks<sup>1B</sup> besitzt an dieser Position NESE, so dass zur Vermutung steht, dass das NXXE-Motiv in D-Rbks<sup>1B</sup> aktiv ist. Dieses Motiv verstärkt normalerweise die Bindung von Phosphat an das Aktive Zentrum. Es ist allerdings möglich, dass diese Bindung auch von der in D-Rbks<sup>33E</sup> vorhandenen NQEA-Sequenz oder von Aminosäuren an einer anderen Position gewährleistet wird. Hier bedarf es noch weiterer Analysen. Andererseits sollte geklärt werden, inwieweit die Funktion des Enzyms ohne diese Aminosäuresequenz einge-

schränkt ist. Die beiden anderen Domänen sind in ihren wichtigen Aminosäuren hochkonserviert. An Position 41 bis 65 befindet sich die ' $\alpha\beta\alpha$ '- oder 'Sandwich'-Domäne mit zwei aufeinanderfolgenden Glycinen, welche spezifische Bindungsinteraktionen der Substrate Ribose und ATP durchführt. An Position 253 bis 266 befindet sich die ATP-Bindestelle mit der katalytischen Base. Dieses Motiv ist in *D-Rbks*<sup>bubbles33E-m</sup> nicht mehr vorhanden.

Neben diesen Merkmalen fällt auf, dass D-Rbks<sup>33E</sup> einen einzigartigen C-Terminus besitzt mit insgesamt 114 Aminosäuren. Es konnte mit Hilfe der Sequenzüberprüfung der cDNA gezeigt werden, dass dieser C-Terminus tatsächlich translatiert wird. Desweiteren ist aber eine RT-PCR mit spezifischen Primern dieser Sequenz zur Bestätigung notwendig. Ein Abgleich dieser C-terminalen Sequenz in eine Domänenvergleichsbank ergab keine Übereinstimmung mit bekannten Domänen. Bei genauerer Betrachtung fällt aber die relativ hohe Anzahl an 30 Prolinen im C-terminalen Bereich auf. Dies lässt vermuten, dass es sich um eine prolinreiche Region handelt. Die Aminosäure Prolin bildet eine besondere Molekül-Konformation (Williamson 1994) und es wird beschrieben, dass eine Aminosäuresequenz mit mehrere Prolinen an SH3- und WW-Domänen von Proteinen binden kann (Ren *et al.* 1993; Finan *et al.* 1994). Dies ist deswegen interessant, da dies ein Anknüpfungspunkt an die Myogenese in *Drosophila* wäre, worauf im nächsten Abschnitt näher eingegangen wird.

#### **6.2.4 Wie könnte D-Rbks<sup>33E</sup> in die Prozesse der Muskelentwicklung von *Drosophila melanogaster* einzuordnen sein**

Nun ist zu klären, wie ein Protein wie die D-Rbks<sup>33E</sup> in den Prozess der Myogenese von *Drosophila* eingeordnet werden kann. In den nächsten Unterabschnitten sollen daher fünf Hypothesen diskutiert werden, welche auf verschiedene Aspekte bezüglich der vorliegenden Informationen über Funktionen von Ribokinasen aus Bakterien und Säugern, hauptsächlich der ATP-Hydrolyse eingehen. Zudem ist die Hypothese zu diskutieren, ob D-Rbks<sup>33E</sup> seine Aufgabe indirekt über Interaktionspartner oder über die Bindung von SH3- bzw. WW-Domänen-Proteinen über seinen prolinreichen C-Terminus vollziehen kann. Die Abbildung 42 stellt die folgend beschriebenen Hypothesen, die sich nicht unbedingt gegeneinander ausschließen müssen, in einem Diagramm dar.

**Erste Hypothese: D-Rbks<sup>33E</sup> beeinflusst die Aktin-Polymerisierung durch den Austausch von ATP und ADP an Aktin** Die ATP-Hydrolyse spielt eine wichtige Rolle in vielen Entwicklungsprozessen. So wird z. B. die Hydrolyse von Aktin-gebundenem ATP und das daraus resultierende  $\gamma$ -Phosphat für die Aktin-Filamentelongation und -Abbau benötigt (Pollard *et al.* 2000). Das gebundene Nukleotid beeinflusst die Rate der Aktin-Assoziation und -Dissoziation an den beiden Filamentenden sowie die Affinität von regulatorischen Proteinen (Pollard 1986). Profilin hat z. B. eine höhere Affinität an ATP-Aktin als an ADP-Aktin (Mogilner & Edelstein-Keshet 2002).

Die ATPase-Aktivität des Arp2/3-Komplexes stimuliert in primären Myoblasten-Zelllinien die Bildung von Aktin-Filamenten und diese ist abhängig von der Hydrolyse Aktin-gebundenen ATP an Arp2 im aktivierten Komplex (Boczkowska *et al.* 2008). Dieser Umstand lässt die Wichtigkeit von

ATP in Schlüsselprozessen der Myogenese erahnen und ergibt Möglichkeiten, wie weitere Untersuchungen mit *D-Rbks*<sup>33E</sup> diese Hypothese stützen könnten. Ribokinasen können ATP hydrolysieren und daher wäre es denkbar, dass *D-Rbks*<sup>33E</sup> ebenfalls Aktin-gebundenes ATP hydrolysieren kann und dadurch einen ähnlichen Prozess wie die Aktin-Polymerisierung durch Arp2/3 reguliert oder diesen Komplex unterstützt. Um einen ersten Eindruck in diesen Prozess zu bekommen, sind Doppelmutanten von *D-Rbks*<sup>bubbles33E-m</sup> mit bekannten Mutanten von Aktin-Regulatoren wie *arp3*<sup>schwächling</sup> oder *wasp*<sup>3D3-035</sup> herzustellen. Durch eine Verstärkung des mutanten Phänotyps würde eine Beteiligung an diesem Prozess in Frage kommen. Des weiteren können Zellkultur-Experimente mit ATP-Inhibitoren bei einer Analyse behilflich sein, da anschließend durch eine externe Zugabe von *D-Rbks*<sup>33E</sup> eine Reversion der Inhibition eintreten könnte. Durch den Einsatz radioaktiv markierten ATPs (P<sub>33</sub>) wäre ein direkter Nachweis der Hydrolyse von ATP in ADP und P<sub>i</sub> möglich und dadurch kann in einem direkten Vergleich die Hydrolyse-Rate des Allels *D-Rbks*<sup>bubbles33E-m</sup> zur Rate der wildtypischen Rate gesetzt werden.

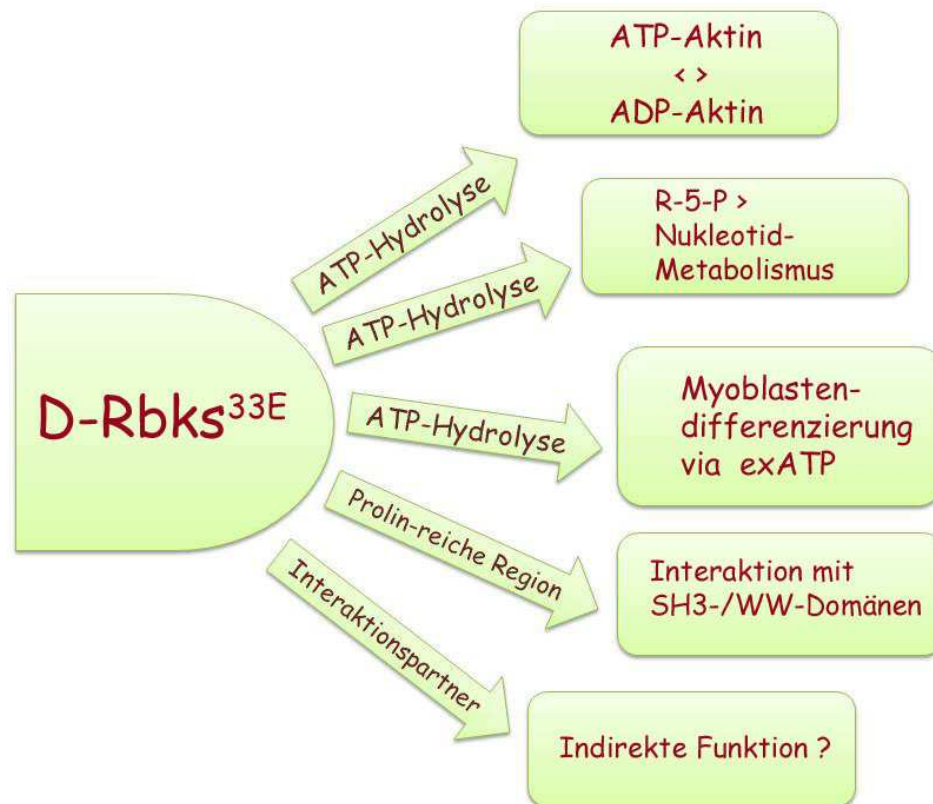


Abbildung 42: Die fünf Hypothesen einer Erklärung für eine potentielle Funktion von *D-Rbks*<sup>33E</sup> in der Myogenese. Es werden mögliche Funktionen anhand der bekannten Funktion der ATP-Hydrolyse, der putativ vorhandenen Prolin-reichen Region und anhand der postulierten Interaktionspartner von *D-Rbks*<sup>33E</sup> diskutiert.

**Zweite Hypothese: Die Ribokinase D-Rbks<sup>33E</sup> beeinflusst den Nukleotid-Metabolismus durch Aktivierung von Ribose in Ribose-5-Phosphat** Die ursprünglich beschriebene Aufgabe von Ribokinasen ist die Aktivierung von Ribose in Ribose-5-Phosphat zur Weiterleitung in den Pentose-Phosphat-Signalweg. Dieser Signalweg ist u. a. die Hauptquelle von NADPH für biosynthetische Prozesse wie z. B. die Fettsäuresynthese und die Assimilation von anorganischen Stickstoff (zusammengefasst in Neuhaus & Emes 2000). Außerdem hält er das Redoxpotential in der Zelle aufrecht, um sie gegen oxidativen Stress zu schützen (Juhnke *et al.* 1996). Die aktivierte Ribose kann alternativ auch als Kohlenstoffquelle für die Synthese von Nukleotiden, Histidinen und Tryptophan dienen (Anderson & Cooper 1969; Lopilato *et al.* 1984). Weitere Moleküle mit Ribose sind u. a. das Rückgrat der RNA, sowie ATP, ADP, AMP und hier besonders cAMP als sekundärer Botenstoff. Diese alternative Einsatzmöglichkeit ist hinsichtlich weiterer Überlegungen bezüglich einer Funktion von D-Rbks<sup>33E</sup> interessant. Ribose-Moleküle müssen vor ihrer Verwendung durch Phosphat aktiviert werden. Eine fehlende Aktivierung kann unterschiedlich starke Folgen im Zellmetabolismus zeigen. So ist die Herstellung von Nukleotiden für den Aufbau von RNA nicht mehr möglich. Wichtige Funktionen in der Zelle können nicht mehr durchgeführt werden. Dieser Ansatz könnte die angenommene fehlerhafte Integrität der Myoblasten in *D-Rbks<sup>bubbles33E-m</sup>* erklären, wenn in diesen Zellen der Transkriptionsprozess blockiert ist. Allerdings erfordert dies eine strenge zeitliche Regulation, da die Myoblasten in den mutanten Embryonen noch determiniert werden und zu einem gewissen Prozentsatz noch fusionieren. Daher ist es eher unwahrscheinlich, dass dies der Mechanismus ist, welcher in *D-Rbks<sup>bubbles33E-m</sup>* fehlerhaft ist. Um diese Hypothese zu analysieren, können ebenfalls Zellkultur-Analysen Aufschluss geben. Falls nach einer Transfektion der Zellen mit einem *D-Rbks<sup>bubbles33E-m</sup>*-Konstrukt Veränderung im Zellverhalten zu beobachten sind, sollte extern hinzugefügte Ribose-5-Phosphat (R-5-P) in der Lage sein, die Zellen normal entwickeln zu lassen.

**Dritte Hypothese: D-Rbks<sup>33E</sup> beeinflusst die Myoblasten-Differenzierung über die Regulation von (extrazellulärem) ATP** An dieser Stelle wird überlegt, wie eine Ribokinase über den Prozess der ATP-Hydrolyse hinaus eine andere Rolle als die Ribose-Aktivierung ausüben kann. Aufgrund von Veröffentlichungen wird hier auf das Thema des extrazellulären ATPs eingegangen (Choo *et al.* 2008). Extrazelluläres ATP (exATP) kann in C2C12-Zellen als Ligand Entwicklungsstimuli durch Purin-Rezeptoren bei der Differenzierung von Säugermuskelzellen vermitteln. Die Synthese von extrazellulärem ATP erfolgt hauptsächlich durch eine sekretierte Form der Adenylatkinase in Myotuben (Choo *et al.* 2008). Adenylatkinasen katalysieren die Reaktion  $ATP + AMP \leftrightarrow 2ADP$  als Vorstufe für den Kalzium-abhängigen zyklischen AMP (cAMP - cyclic AMP)-Signalweg im Skelettmuskel. exATP ist ein Vermittler der chemosensorischen Transduktion im zentralen Nervensystem (Gourine *et al.* 2005) und der Skelettmuskel-Kontraktibilität (Sandona *et al.* 2005) und bindet an zwei purinerge Rezeptoren: P2X und P2Y. P2X-Rezeptoren sind Liganden-öffnende Ionenkanäle, während P2Y-Rezeptoren G Protein-gekoppelte Rezeptoren darstellen (Abbraccio *et al.* 2003). Beide Rezeptoren haben mehrere Untertypen. Im Skelettmuskel agiert exATP durch den Untertyp P2X<sub>4</sub> und induziert den Ca<sup>2+</sup>-Ioneneintritt für die Muskel-Kontraktion (Sandona *et al.* 2005). Die

Aktivierung des Untertyps P2X<sub>5</sub> durch ATP wird benötigt für die Muskeldifferenzierung in Säugern (Araya *et al.* 2004). Zusätzlich stimuliert exATP die Aufnahme von Glukose in C2C12-Zellen durch die Purin-Rezeptoren zur Lieferung von Energie für die Abläufe in Skelett-Muskelzellen (Kim *et al.* 2002).

Die Myogenese und speziell die Fusion ist ein sehr energieverbrauchender, weil auch sehr schnell ablaufender Prozess und benötigt daher viel ATP als Energielieferant. Der theoretische Hintergrund zeigt Möglichkeiten, D-Rbks<sup>33E</sup> über die Analyse des ATP-Haushaltes der Myoblasten in diesen Prozess zu integrieren. Dies lässt sich *in vivo* in der Fliege nicht bewerkstelligen, da neben der Myogenese viele weitere Prozesse von ATP reguliert werden, und daher ist es wichtig, ein Zellkultur-basiertes System zur Analyse von ATP zu entwickeln. Eine andere Herangehensweise ist über die Analyse der Homologen von Purin-Rezeptoren in *Drosophila* möglich. Die Untertypen P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>6</sub> sind in *Drosophila* kodiert von *allostatin C-Rezeptor 2 (alCR2)* bzw. *tachykinin-like receptor at 99D (takr99D)*. Beide Proteine sind membranständige Bestandteile des G-Protein gekoppelten Rezeptor-Signalweges, aber wahrscheinlich nicht im Embryo exprimiert (<http://flybase.org/>). Aber trotz dieser Daten sind die erhältlichen P-Element-Linien letal, weshalb eine Analyse der embryonalen Muskulatur erfolgen sollte. Die Untertypen P2X<sub>4</sub> und P2X<sub>7</sub> werden kodiert durch *terribly reduced optic lobes (trol)* bzw. *plexinA (plexA)*. PlexinA ist in der Wegfindung von Motoraxonen beteiligt und während der Embryogenese exprimiert, während Trol ebenfalls in der Neurogenese in dem Schritt der asymmetrischen Neuroblasten-Teilung integriert ist (<http://flybase.org/>). Auch hier sind Mutanten beider Gene vorhanden, so dass Doppelmutanten mit *bubbles<sup>33E-m</sup>* Aufschlüsse geben können, ob die Mutationen sich gegenseitig verstärken und so Hinweise auf mögliche betroffene Prozesse geben können.

**Vierte Hypothese: Die Ribokinase D-Rbks<sup>33E</sup> interagiert mit ihrer C-terminalen prolinreichen Region mit SH3-/WW-Domänenproteinen** Dieser Punkt wurde bereits im vorherigen Teil kurz erwähnt. In D-Rbks<sup>33E</sup> ist C-terminal ein prolinreicher Bereich lokalisiert und es soll nun geklärt werden, ob diese Proline eine Funktion in der Form von PRRs (PRR - prolin-rich regions) durchführen. Es ist möglich, dass D-Rbks<sup>33E</sup> seine Funktion nicht durch die Funktion der ATP-Hydrolyse, sondern indirekt über die Interaktionspartner durchführen kann. Alternativ können solche Partner die Ribokinase an die Bestimmungsorte transportieren.

Es ist bekannt, dass SH3- sowie WW-Domänen mit PRRs interagieren (Ren *et al.* 1993; Finan *et al.* 1994) und in *Drosophila* sind mit Myoblast city (Mbc) und Crk zwei myogeneserelevante SH3-Domänenproteine bekannt. Die den SH3-Domänen analogen WW-Domänen (Macias *et al.* 1996) sind in Proteinen wie z. B. Dystrophin und dem Notch-Inhibitor Suppressor of deltex (Su(dx), Fedoroff *et al.* 2004) vertreten. Dystrophin ist ein struktureller Bestandteil der Muskeln und essentiell für die Integrität der Muskulatur in *Drosophila* (van der Plas *et al.* 2007).

Eine durch eine Bindung mit SH3- bzw. WW-Proteinen mögliche Beteiligung des C-terminalen Bereiches an der Funktion von D-Rbks<sup>33E</sup> kann mit Hilfe von Hefe-Zwei-Hybrid-Untersuchungen speziell mit diesem Bereich des Proteins und z. B. Mbc, Crk und Dystrophin untersucht werden. So

sind mögliche Interaktionspartner zu identifizieren. Darüber hinaus bieten sich auch Doppelmutanten von Crk bzw. Mbc mit *D-Rbks<sup>bubbles33E-m</sup>* an. Über diesen Weg lässt sich indirekt ein Zugang der Ribokinase in die Prozesse der Myogenese ermitteln, so dass bei einer erfolgreichen Interaktion die weiteren Experimente geplant werden können. So ist Mbc als GTPase an der Vermittlung des Fusionssignals zum Aktin-Zytoskelett beteiligt. Eine Interaktion würde daher die Ribokinase an diesen Signalweg zusammen mit Mbc koppeln, so dass in einem solchen Fall von einem weiteren Komponente in der Signaltransduktion der Myoblastenfusion gesprochen werden könnte. Schließlich kann der spezifische C-Terminus mit Hilfe eines Hefe-Zwei-Hybrid-’Screens’ gegen eine cDNA-Bank durchgeforscht werden, um weitere Proteine zu identifizieren, welche mit diesem Bereich und somit mit *D-Rbks<sup>33E</sup>* interagieren.

**Fünfte Hypothese: Die Ribokinase *D-Rbks<sup>33E</sup>* besitzt durch ihre Interaktionspartner nur indirekt eine Funktion im Mesoderm** Im diesem Abschnitt soll die Möglichkeit einer indirekten Funktion von *D-Rbks<sup>33E</sup>* über Interaktionspartner analysiert werden, welche nicht notwendigerweise an den C-Terminus binden. In der Datenbank SMART werden mehrere mögliche Interaktionspartner angegeben (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). Dabei sind die meisten Proteine wahrscheinlich mit *D-Rbks<sup>33E</sup>* gemeinsam im Pentose-Phosphat-Signalweg involviert, da sie für Transketolasen (CG5103) und Ribose-Phosphat-Diphosphokinasen (CG2246 und CG6767) kodieren. Transketolasen (2.2.1.2) katalysieren den reversiblen Transfer von Ketolgruppen von Xylulose-5-Phosphat auf einen Aldose-Rezeptor wie Ribose-5-Phosphat zur Bildung von Sedoheptulose-7-Phosphat und Glyceraldehyd-3-Phosphat während Ribose-Phosphat-Diphosphokinasen (2.7.6.1) Phosphatgruppen auf Ribose-5-Phosphat zur Aktivierung in Phosphoribosyl-5-Pyrophosphat (PRPP) übertragen. Ribosephosphat-Diphosphokinasen sind dahingehend interessant, da das R-5-P zuerst in PRPP umgewandelt werden muss, um in den Nukleotid-Signalweg zu gelangen und so eine Verbindung zum zweiten Ansatz hergestellt wird. Die komplexen Signalwege des Pentose-Phosphat- und des Nukleotid-Signalweges sind auf <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html> ausführlich dargestellt.

Interessanterweise zeigen sich schwache *in situ*-Expressionsmuster laut BDGP für CG6767, weshalb mittels *in situ*-Hybridisierungsanalysen die mRNA-Expression bereits selbst analysiert, aber bisher diese Ergebnisse nicht verifiziert werden konnten. Die anderen Gene wurden bisher nicht untersucht, was aber im Anschluss an diese Arbeit erfolgen sollte. Weitere Interaktionspartner sind bei Droid (Drosophila Interaction Database: <http://www.droidb.org>) aufgeführt. CG4289 ist ein Faktor, welcher Proteine zum Peroxisom transportieren kann. Das Peroxisom ist ein membranumhülltes Vesikel zum oxidativen Abbau von Fettsäuren und Alkoholen. Aufgrund dieser Funktion wird die Analyse von CG4289 nicht vorrangig behandelt wird. Interessant sind mit Hsc70-1 und Hsc70-4 die weiteren Interaktionspartner von *D-Rbks<sup>33E</sup>*, zwei Hitzeschockproteine mit ATPase-Aktivität. Für Hsc70-4 ist bekannt, dass es an der Axon-Weiterleitung und dem Vesikel-vermittelten Transport beteiligt ist. Möglicherweise können Doppelmutanten der beiden Hsc-Proteine mit *D-Rbks<sup>bubbles33E-m</sup>* weitere Informationen liefern, da der Transport von Vesikeln bei der Fusion der FCMs mit den FCs bzw. mit

der wachsenden Myotube einen zentralen Prozess darstellt. Da über den genauen Ablauf während dieses Transports und dadurch über die Fusion bisher nur spärliche Information vorliegen, wäre eine erste Ansatzmöglichkeit für mögliche Kenntnisse dieses Ablaufes gegeben.

Hsc-Proteine gehören zur Gruppe der ATPasen, da sie eine ‚Aktin-Falte‘ besitzen, wie sie bereits in Kapitel 6.1.1.3 beschrieben ist. Dies ist soweit interessant, da durch eine mögliche Interaktion der Hsc-Proteine mit eine D-Rbks<sup>33E</sup> erhöhte Rate der ATP-Hydrolyse gewährleisten könnte. Dadurch kann schnell viel Energie freigesetzt werden, was z. B. für solch aufwändige Prozesse wie die Myoblastenfusion notwendig ist. Bei Ausfall dieser Energie kann dieser Prozess nicht mehr aufrecht erhalten werden. Da Hitzeschock-Proteine wichtige Stabilisatoren von Proteinen sind, die korrekte Proteinfaltung vermitteln und auch Apoptose-relevante Faktoren inaktiv halten können, kann hier der Kreis zur Integrität der Myoblasten in D-Rbks<sup>33E</sup> geschlossen werden. Schließlich sollten, neben eine Hefe-Zwei-Hybrid-’Assay’ spezifisch mit dem C-Terminus, solch ein ’Screen’ mit anderen Bereichen von D-Rbks<sup>33E</sup> durchgeführt werden. Möglicherweise können weitere Interaktionspartner von D-Rbks<sup>33E</sup> identifiziert, welche im Zuge einer Interpretation bezüglich einer Funktion in der Myogenese hilfreich wären.

### **6.3 Das $\text{Ca}^{2+}$ -Bindepotein ist in den FCMs exprimiert und möglicherweise relevant für die Myoblastenfusion**

Wie die Einleitung zeigt, ist die embryonale Entwicklung der somatischen Muskulatur ein bereits in Ansätzen untersuchter Prozess. Es ist bekannt, dass die Myoblasten über Duf und Sns eine heterologe Adhäsion durchführen, woraufhin eine Fusions-Maschinerie in Gang gebracht wird, infolge dessen die FCMs in die FC bzw. wachsenden Myotuben integrieren. Viele myogenese-relevante Faktoren besitzen funktionelle Orthologe in z. B. Maus und Mensch. Bei Säugern hingegen gibt es Signalwege und Faktoren in der Muskelentwicklung und -physiologie, welche bisher nicht in *Drosophila* beschrieben wurden, wie z. B. die Verwendung von  $\text{Ca}^{2+}$  als Signalmolekül und den dazu notwendigen Transport dieses Moleküls mittels  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindepoteinen oder  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen (Berridge *et al.* 2000; Calahan 2009; Ebashi *et al.* 1969).

Darüber hinaus gibt es viele Vorgänge in *Drosophila*, welche noch genauerer Analysen bedürfen. Dazu gehört auch die Aufschlüsselung von Prozessen wie die Lyse der elektronendichten Vesikel im Präfusionskomplex als Übergang zur Bildung der elektronendichten Plaques. In höheren Organismen ist die Lysierung von Vesikeln durch  $\text{Ca}^{2+}$  reguliert (Pores-Fernando & Zweifach 2009), weshalb die Hypothese aufgestellt wurde, dass auch in *Drosophila* dieser Prozess durch  $\text{Ca}^{2+}$  kontrolliert werden könnte. Ein wichtiger Bestandteil im Kalzium-Signalweg sind  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindepoteine, welche die Ionen binden und an ihrem Bestimmungsort festhalten oder dorthin transportieren können. Sie weisen bestimmte Bindestellen für  $\text{Ca}^{2+}$  auf, welche in der Domäne des EF-Hand-Typs zusammengefasst sind (Abb. 43). Diese Domänen bilden Dimere und können so über zusätzliche Konformationsänderungen  $\text{Ca}^{2+}$  binden (zusammengefasst in Schwaller 2009).



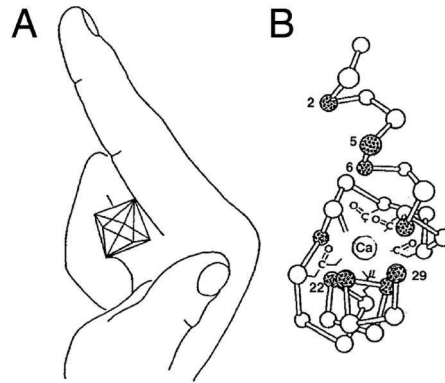


Abbildung 43: **Die EF-Hand-Domäne besitzt eine charakteristische Molekülanordnung.** Die drei-dimensionale Struktur der EF-Hand-Domäne (B) kann durch die Finger der rechten Hand dargestellt werden (A). Der Zeigefinger repräsentiert die E-Helix, der gekrümmte Mittelfinger steht für die Aminosäuren der  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindestelle und der Daumen stellt die F-Helix dar. Die genaue Beschreibung der einzelnen Moleküle neben dieser Abbildung befinden sich in dem Übersichtsartikel von Schwaller 2009.

Aufgrund dieser Informationen wurde das Proteom von *Drosophila* nach Proteinen mit EF-Hand-Domänen durchsucht und mit weiteren Datenbanken bezüglich vorhandener Expressionsmuster auf RNA-Ebene untersucht. Auf diese Weise konnte *kosh* (CG10641) identifiziert werden. Die RNA-Expression von *kosh* beschränkt sich spezifisch auf das somatische und viszerale Mesoderm und ist neben weiteren Stadien zur Zeit der Myoblastenfusion exprimiert. Dies führt anschließend zu neuen experimentellen Möglichkeiten. In erster Linie ist nun die Protein-Verteilung von Kosh interessant, um die subzelluläre Lokalisation in den Myoblasten zu zeigen. Daher folgte die Herstellung eines Peptidantikörpers, dessen Analyse im Rahmen einer Masterarbeit erfolgt.

Kosh ist nach 'Array'-Daten spezifisch in den FCMs exprimiert (Estrada *et al.* 2006). Diese Expression konnte mittels des Peptidantikörpers bereits bestätigt werden und somit kann Kosh einen Faktor darstellen, welcher die Schritte in der Auflösung des Präfusionskomplexes oder der anschließenden Bildung der elektronendichten Plaques reguliert oder zumindest in diesen Prozess involviert ist. Dazu können, mit Hilfe eines spezifischen Kosh-Antikörpers, Mutanten der besagten Prozesse analysiert werden. Eine erste Wahl sind z. B. *blown fuse*- und *singles bar*-Mutanten, da diese in unterschiedlichen Stadien während des Vorganges der Vesikellyse stoppen. Es sollte angenommen werden, wenn Kosh als Kalzium-Bindeprotein an der Verteilung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen während der Lysierung als Signalmolekül beteiligt ist, in den Mutanten eine Veränderung in der Expression von Kosh zu beobachten ist.

Ebenso sind Mutanten von *kosh* von großer Wichtigkeit, da bei der postulierten Funktion ein Stopp der Fusion zu eben diesen Prozessen wie der Vesikellyse, ähnlich zu *singles bar*, anzunehmen ist. Kosh ist lokalisiert in 37C auf dem linken Arm des zweiten Chromosoms und bisher sind keine Mutanten von Kosh erhältlich. Kosh besitzt neben zwei EF-Hand-Domänen eine Coiled-Coil-Sequenz, welche mittels spezifischer Protein-Interaktionen Homo- bzw. Heterodimere mit weiteren Coiled-Coil-

Proteinen bilden kann. Diese Domänenstruktur bietet Ansätze für Deletionskonstrukte zur Herstellung von spezifischen Mutanten.

Da *kosh* auch während der Fusionsstadien im viszeralem Mesoderm exprimiert ist, könnte hier eine erste Beschreibung ultrastruktureller Eigenschaften in diesem Gewebe erfolgen. Bisher konnte nicht gezeigt werden, dass die Fusion der viszeralem Myoblasten in Anwesenheit elektronendichter Vesikel und Plaques stattfindet. Mit Hilfe von *kosh* könnten die Schritte der viszeralem Fusion weiter aufgeklärt werden. Daher geben die ersten Analysen zusammenfassend Hinweise auf eine neue Klasse von Proteinen, welche die embryonale Entwicklung der larvalen Muskulatur von *Drosophila* in Abhängigkeit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen regulieren können.

Kalzium ist als sekundäres Signalmolekül ein wichtiger physiologischer Faktor und für Säugermuskeln ist die Notwendigkeit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen eingehend beschrieben worden (Horsley & Pavlath 2004). So ist der gesamte Mechanismus der Kontraktion und Relaxierung der Muskelfasern abhängig von den richtigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen-Konzentrationen. Die Kontraktion erfolgt über das Freisetzen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Moleküle aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR). SERCAs (Sarco(endo)plasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen) katalysieren dabei den ATP-abhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport vom Zytosol zum Lumen des ERs. Die Relaxierung erfolgt anschließend über das schnelle Entfernen des cytosolischen Kalziums (Tupling 2009). In Säugermuskeln ist das prominente  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindeprotein Calsequestrin, welches in Polymerform  $\text{Ca}^{2+}$  zu den benötigten Orten bringt. Bei einer Protein-Blast-Analyse der Sequenz des menschlichen Calsequestrin1 werden zwei Proteine in *Drosophila* angezeigt: CG9911 mit einer 50 %igen Übereinstimmung und CG5027 mit etwa 45 % Übereinstimmung. Beide Proteine haben eine vorhergesagte Funktion als Redox-Regulatoren, da sie beide Thioredoxin-Domänen besitzen, über die sie verschiedene reduktive Prozesse mittels Oxidation katalysieren (zusammengefasst in Holmgren 1985). Ebenso gibt es eine spezifische SERCA in *Drosophila*: Ca-P60A (Ca-P60A - Calcium ATPase at 60A). Ca-P60A ist in der Fliege an der Regulation der Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen involviert und darüber hinaus notwendig für die Zell-Lebensfähigkeit und Gewebe-Morphogenese während der Entwicklung. Weiter wird beschrieben, dass die Funktion von Ca-P60A für die intrazelluläre Lokalisation des Notch-Rezeptors notwendig ist (Periz & Fortini 1999). Dies ist insofern interessant, als dass auch Notch in der Myogenese für die Determination der FCs und FCMs benötigt wird. Es sollte daher angestrebt werden, die *Drosophila*-spezifischen Gene der Kalzium-regulierenden Faktoren auf mögliche Beteiligung an der Myogenese zu analysieren. Die im Anhang dargestellte Liste der Proteine mit EF-Hand-Domänen zeigt, dass es viele Kalzium-abhängige Faktoren in *Drosophila* gibt, welche bezüglich ihrer Expression im Mesoderm untersucht werden können. Es ist nicht unwahrscheinlich, dass neben Kosh weitere Faktoren für die Regulation von  $\text{Ca}^{2+}$  in der Muskelkontraktion und -Relaxierung oder auch bereits vorher in der Muskelentwicklung notwendig sind. Eine Redundanz in den vorhergesagten Funktionen von Kosh mit weiteren bisher nicht identifizierten  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Faktoren kann zu diesem Zeitpunkt auch nicht ausgeschlossen werden. Daher ist hier in Form der Auflistung ein Ansatzpunkt für weitere Analysen gegeben, da die vorhandenen cDNAs oder Mutanten auf ihre Expression bzw. ihren möglichen mutanten Phänotyp untersucht werden können. Hier besteht allerdings die Möglichkeit, wie bereits

oben erwähnt, einer Redundanz zwischen  $\text{Ca}^{2+}$ -regulatorischen Proteinen. Dies lässt sich durch die Herstellung von Doppelmutanten umgehen. Zu Beginn der hier angestrebten Analyse wurden die Proteine mit mehreren unterschiedlichen Domänen außer Acht gelassen, da sich hier nur auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung durch EF-Hand-Domänen konzentriert werden sollte. Es ist aber nicht auszuschließen, dass die anderen aufgelisteten Proteine wie Calpain-B oder auch Calmodulin in Redundanz mit z. B. Kosh oder anderen Bindeproteinen wirken können.

Die hier begonnene Analyse zeigt, dass es verschiedene Möglichkeiten zur Analyse der Rolle von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in der Entwicklung der Muskeln von *Drosophila* gibt. Kosh ist hier zur Zeit ein vielversprechender Ansatz, da es sich um ein muskelspezifisches  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindeprotein handelt und möglicherweise ein Faktor ist, welcher einen Teilschritt im Prozess der Myoblastenfusion reguliert.

## 6.4 Ausblick

Im Laufe dieser Arbeit konnten zwei Faktoren identifiziert werden, welche sich zu diesem Zeitpunkt nur bedingt in die Signalwege der Myogenese eingliedern lassen. Zu diesem Zweck müssen die bereits in der Diskussion angesprochenen Analysen durchgeführt werden. Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass es sich bei der Ribokinase D-Rbks<sup>33E</sup> um ein in der Entwicklung der Muskulatur benötigtes Enzym handelt, welches seine Funktion möglicherweise über die Regulation des ATP-Haushalts ausführt. Die zukünftigen Experimente umfassen neben der Analyse von Mutanten bzw. Doppelmutanten und die Durchführung von Hefe-Zwei-Hybrid-‘Screens’ parallel auch Anwendungen von Zellkultur-Systemen. Hier ist zu beachten, wie bereits erwähnt wurde, dass die Ergebnisse, welche durch Zellkultur-basierte Analysen erhalten werden, nicht die *in vivo*-Situation darstellen. Daher sollte auf primäre Myoblasten-Zellkulturen zugegriffen werden, da die so erhaltenen Ergebnisse eher die native Situation darstellen können.

Über diesen Ansatz hinaus besteht die Dringlichkeit, *D-Rbks*<sup>bubbles33E-m</sup> und die beiden weiteren entkoppelten Mutanten, *32F-sm* und *33E-vm*, genauer zu analysieren, z. B. über Proteinexpressions-Studien von Faktoren der putativ involvierten Signalwege. Es bieten sich auch Elektronenmikroskopie (EM)-Analysen an, da in *D-Rbks*<sup>bubbles33E-m</sup>-Embryonen die Adhäsion zwischen den Myoblasten noch stattfindet und es geklärt werden sollte, auf welchem Level sich die Muskulatur in den Mutanten nicht weiter entwickelt. Der Schwerpunkt in der Auswertung ist dabei auf die Analyse der ultrastrukturellen Eigenschaften während der Fusion zu legen. Es stellt sich also die Frage, ob *D-Rbks*<sup>bubbles33E-m</sup>-Embryonen noch in der Lage sind, den Präfusionskomplex oder die elektronendichten Vesikel aufzulösen, ob die Mutanten die Membran noch vesikulieren können, aber anschließend keine Integration der FCM in die wachsende Myotube mehr möglich ist.

Daneben ist das Kalzium-Bindeprotein Kosh zu analysieren und es zeigten sich bereits erste Hinweise auf eine Funktion während der Myoblastenfusion. Hier stehen Experimente wie die genaue Analyse der Proteinverteilung von Kosh an. Es stellt sich die Frage, ob Kosh in beiden Muskelgeweben, somatisch und viszeral, im gleichen Prozess benötigt wird. Daran anschließen sollte sich die Herstellung von Mutanten, entweder über Deletionskonstrukte oder mit Hilfe der homologen Re-

kombination. Daran anschließend sind ebenfalls Analysen der ultrastrukturellen Eigenschaften von *kosh*-Mutanten anzustreben. Darüber hinaus können die im Anhang aufgeführten weiteren  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Proteine auf eine Funktion in der Muskulatur hin analysiert werden. Es könnten sich daraus weitere Kandidaten für die Aufschlüsselung der Prozesse bei der Entstehung der larvalen Muskulatur in *Drosophila melanogaster* ergeben.

## A Anhang

### A.1 Tabelle der analysierten Gene, lokalisiert in 32F2-33A1 bzw. 33E1-33E3 und ausgewählte Charakteristika

#### A.1.1 Region 32F2-33A1

Name des Gens	Analyse	vorhergesagte Domänen	putative Rolle (flybase.org)	Expressionsmuster (www.fruitfly.org/cgi-bin/ex/insitu.pl)	Interaktionspartner
<i>sala</i> ( <i>spalt-ajacent</i> , CG4922)	nein	Signalpeptid	-	Tracheenanlagen, Tracheen, Epidermis	u.a. Diaphanous, Spalt major, Charlatan
CG6488	ja	Dor1-ähnliche Domäne	-	-	u.a. cdk5, Minibrain
<i>spz4</i> ( <i>spatzle4</i> , CG14928)	nein	Signalpeptid, Cystin-Knoten-Cytokin-Domäne	-	-	diverse CGs
CG6509	ja	PDZ-Domäne, Coiled-coil-Sequenz, SH3-Domäne	antimicrobial humoral response	-	u.a. Regucalcin, Zasp52, Armadillo, Cornetto
CG4970	nein	-	-	-	u.a. Neosin
CG14929	nein	-	-	-	-
CG14930	nein	Histon-Falte	DNA-Bindung	-	-
CG31705	nein	-	-	maternal, Dotterzellen	CG13996
CG31706	nein	-	-	-	-
CG34162	nein	zehn Trans-membran-Domänen	-	-	-
<i>mst33A</i> ( <i>male sterile 33A</i> ; CG6541)	nein	-	-	-	diverse CGs
<i>acp33A</i> ( <i>accessory gland protein</i> )	nein	Signalpeptid	Hormonaktivität, negative Regulation der Aufnahme von Spermien im Weibchen	-	Acp-Komplex-Bestandteile
CG15841	nein	-	-	-	-
<i>giac</i> ( <i>giacomo</i> , CG6589)	ja	UNC-ähnliche Domänen	Spermatiden-Entwicklung	-	u.a. Zasp52

<i>kek2 (kekkon2; CG4977)</i>	ja	sieben LRRs, IG-Domäne	Protein-Bindung	-	Ribosomal protein S27A
<i>CG6614</i>	ja	TPR	Bindung	-	-
<i>CG12307</i>	nein	-	-	-	-
<i>CG4983</i>	ja	Myosin-Motordomain	-	-	CG14101, CG10080, Arp1, CG13741, Scap
<i>CG4988</i>	nein	Aldose1-Epimerase-Domäne	-	-	diverse Hexokinasen
<i>CG12602</i>	ja	ATPase	ATP-Synthese gekoppelter Protonentransport	-	u.a. verschiedene $\alpha$ -Tubuline
<i>CG42470</i>	nein	Signalpeptid	-	-	-
<i>CG42471</i>	nein	Signalpeptid	-	-	-
<i>sfp33A1 (seminal fluid protein 33A1; CG42472)</i>	nein	KU-Domäne	-	-	-
<i>CG14931</i>	nein	-	-	-	u.a. Kurtz, Thrombospondin
<i>CG14932</i>	nein	-	-	-	diverse CGs
<i>tsp33B (CG14936)</i>	ja	drei Transmembran-Domänen, Signalpeptid	-	-	Tsp86D
<i>CG14937</i>	ja	F-Box, RNi-ähnliche Domäne	-	frühes eingewandertes Mesoderm, ZNS	SkpA, SkpB, SkpC, Cdc2c

**Erklärungen zur Tabelle:** (eine genaue Beschreibung der Domänen ist auf der Internetseite <http://www.ebi.ac.uk/interpro/> zu finden)

*Dor1-ähnliche Domäne:* Bestandteil des Sec34/35 Golgi-Transport-Komplex und am Membrantransport beteiligt.

*Cystin-Knoten-Cytokin-Domäne:* 6 Cysteine mit drei verknüpften Disulfid-Brücken.

*PDZ-Domäne:* Interaktionsdomäne, binden oft an interne Peptidsequenzen.

*Coiled-Coil-Sequenz:* Struktur aus zwei oder mehreren  $\alpha$ -Helizes, können Hetero- und Homodimere ausbilden und sind wichtig im Prozess des Andockens und der Fusion von Vesikeln.

*SH3-Domäne:* Src-Homologie-3; oft zu finden in membran-assoziierten enzymatisch-aktiven Proteinen und Adapterproteinen.

*Histonfalte:* DNA-Organisation und Regulation eukaryotischen Transkription.

*Transmembrandomänen:* eine drei-dimensionale Proteinstruktur in einer Membran.

*Signalpeptid:* Peptid-Kette, welche den Transport eines Proteins zu ihrem Bestimmungsort dirigiert.

*UNC-ähnliche Domäne:* Eine dem *C. elegans* UNC-84-Protein ähnliche Domäne; an der Wanderung und Kernverankerung eines Proteins verantwortlich.

*LRR:* Leucin-Rich-Repeat; Beteiligt an Prozessen wie Signaltransduktion, DNA-Reparatur, Rekombination usw. und oft in Zell-Adhäsionsmolekülen und Tyrosinkinase-Rezeptoren zu finden.

*IG-Domäne*: In vielen diversen Proteinfamilien zu finden und beteiligt an der Zell-Zell-Erkennung, Zelloberflächen-Rezeptor-Signalwege, Aufbau der Muskelstruktur und Prozessen im Immunsystem.

*TPR-Repeat*: Tetrico-Peptid-Repeat, vermittelt Protein-Protein-Interaktionen und den Zusammenbau von Multi-Protein-Komplexen.

*Myosin-Motordomäne*: ATPase-Domäne, welche chemische Energie in Form von ATP durch Hydrolyse in mechanische Energie zu Muskelkontraktionsprozessen umwandelt.

*Aldose1-Epimerase-Domäne*: vermittelt die Interkonversion von D-Glukose und anderen Aldosen zwischen ihren  $\alpha$ - und  $\beta$ -Formen.

*ATPase*: Membran-gebundene Enzyme, welche die ATP-Synthese und/oder Hydrolyse mit dem Transport von Protonen durch die Membran kombinieren.

*KU-Domäne*: Sind oft in Serin-Protease-Inhibitoren vorhanden.

*F-Box*: Sequenzmotiv, ursprünglich in Cyclin-F beschrieben, können andere Proteine zu bestimmten Orten rekrutieren.

*RNi-ähnliche Domäne*: Ähnlich zum LRR (s. o.).

### A.1.2 Region 33E1-33E3

Name des Gens	Analyse	vorhergesagte Domänen	putative Rolle (flybase.org)	Expressionsmuster (www.fruitfly.org/cgi-bin/ex/insitu.pl)	Interaktionspartner
<i>CG31862</i>	ja	Coiled coil-Sequenz, Signalpeptid	-	-	-
<i>bru-2 (bruno-2, CG31761)</i>	ja	drei RRM	negative Translationsregulation, RNA-Bindung	-	Elav
<i>CG17010</i>	ja	PfkB-Domäne	Ribokinase-Aktivität	-	CG4289, Hsc70-1, Hsc70-4
<i>CG31763</i>	ja	-	-	-	-
<i>pkd2 (polycystic kidney disease gene 2, CG6504)</i>	ja	eine Trans-membran-Domäne, Coiled-coil-Sequenz, Pkd-Kanal	Kationenkanal-Aktivität, Spermien-Beweglichkeit	-	u.a. $\alpha$ -Actinin, Dia, Rya-r44F, Tm2, EupA, KrT95D
<i>vir-1 (virus-induced RNA; CG31764)</i>	ja	Coiled-coil-Sequenz, Signalpeptid	Virus - Abwehr	ZNS	u.a. Act57B, Aldolase

**Erklärungen zur Tabelle:** (siehe dazu auch A.2.1 und <http://www.ebi.ac.uk/interpro/>)

*RRM*: RNA recognition motif; putative RNA-Bindedomäne.

*PfkB*: Phosphofruktokinase-Domäne; Bereich mit diversen Substrat- und ATP-Bindestellen in Kohlenhydrat- und Pyrimidin-Kinasen.

*Pkd-Kanal*:  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Kationen-Kanal.

## A.2 Die Aminosäuresequenzen der Ribokinase D-Rbks<sup>33E</sup> und *D-Rbks*<sup>bubbles33E</sup>

A	M G K K L D V V V F G T A N I E Y I T Y V P E L P K P G E L	
	0001 ATGGGAAGA AGCTGGATGT GGTGTCTTC GGGACGGCAA ACATCGAATA TATAACATAT GTCCCGGAAT TGCCGAAACC CGGTGAACCT	
	V A G T Y M E T C F G G K G A N Q C V A A A K L G A S T V L	Ribose-Bindestelle (124-165)
	0091 GTCCCGGAA CGTACATGGA GACCTGTTTC GGTGGCAAGG GAGCCAATCA GTGTGTGGA GCTGCCAAT TGCGGGCCTC CACCGTCTCG	
	V A K L S K D F S S D D V L N H L Q Q H E V D V T H V Q Q V	
	0181 GTCCCAAGT TGGGCAAGGA CGAATCGGGC GATGACTACC TAAACCACCT GCAACAGCAC GAGGTTGATG TGACGCAGCT CCAGCAGGTG	
	E N N P T G M S E I A V S E N G D Q Y K I N V A G A N V F L	
	0271 GAGAACATC CCACGGGCAT GAGTGAATC GCGGTTTCTG AGAATGGAGA TCAGTACAAG ATCAACGTGG CTGGTGCAG TGTATTCTC	Primer Teil 2 fwd (378-407)
	T A K D V T R A K K S F Q D A K V L L C Q L E T D M N A T M	
	0361 ACGGCCAAGG ATGTGACCG GGCTAAGAAG TCCTTTCAGG ATGCGAAGGT GCTTCTCTGC CAACTGGAAA CGGATATGAA TGCCACCATG	
	C A L R Q F K G V S L L H M S P M R K D I P N A M I G L P T	Deletion (498-498)
	0451 TGTGCGTTGC GTACATTCAA GGGGGTTTCC CTGCTCCACA TGTGCGCAAT GCGAAAAGAT ATTCCAAATG CCATGATTGG CTGCGCTACT	
	I V V A V Q F A A A W L T D M E E V L T F D Q A R F A A E T	
	0541 ATTCTGGTTG CGAATCAAGA GGCAGCTGCC AACCTAACCG ATATGGAAGA AGTGTTAACC CCTGATCAGG CGCGAAAAGC AGCTGAAACT	
	L T A K G A K S V I I T M G E Q G A V Y M S K K S E D M C T	
	0631 CTTATCGCAA AGGAGGCCAA GAGCGTATC ATTACCATGG GCGAGCAAGG AGCGGTTTAC ATGTCCAAGA AGAGCAAAGA TATGTGCACC	ATP-Bindestelle (757-796)
	H V P A S D V P H L A D F S G A G D A F M G S L A Y H I A R	
	0721 CATGTGCCG CCTCGATGT GCCGCACTTG GCGATCCCT CGGGTGCCGG TGATGCGTTT ATGGGCAGCT TGGCCTATCA CATAGCTCGA	Primer Teil 2 reverse (862-882)
	F P K L S T E H H I S A A H S C A A Y S M G R R G T Q P S F	
	0811 TTTCCCAAAC TGTCACAGA ACATCATATC AGTGCGGCAC ACTCCTGCGC CGCCTACTCC ATGGGCGCCG CGGCACTCA GCCAAGTTTT	
	F C K E S A K S D L C Y S T S T F S V I P F E S S F Q H E D D	
	0901 CCGGGCAAGG AAAGCGCCAA AAGTGACCTA TGCTATTGGA CGCCACGTT TAGTGTCTT CCACCTTCTA GTCCGCAACA TGAAGATGAT	
	N M V T K T P P P S M V V P T P E E A H S Q K E V V E Q	
	0991 AATATGGTAA CAAAGACGCC ACCGCTTCA ATGTAGTCC CTACGCCGA AGAAGCACAC TCCCAAAGG AAGTTGTGGA AGAAGCCAA	
	K P A P P P P E D P V V E A P P P T T S E E P P K A V E T S	
	1081 AAACCTGCAC CTCCTCCACC GGAGGATCG GTTGGAAG CACCTCCACC AACGACCTCC GAGGAACCTC CGAAGCAGT GGAACCTCC	
	N E P P K P A E T T D E P P K P A E T A D Q A P V K P V E T	
	1171 AATGAACCTC CAAAGCCTCG GGAGACCACT GATGAACCTC CAAAGCCTGC GGAGACCGCA GATCAAGCTC CTGTGAARCC CGTGAGACTG	
	A N E P P A N K ?	
	1261 GCTAATGAGC CACTGGCAA CAAAGC	
B	M G K K L D V V V F G T A N I E Y I T Y V P E L P K P G E L	
	0001 ATGGGAAGA AGCTGGATGT GGTGTCTTC GGGACGGCAA ACATCGAATA TATAACATAT GTCCCGGAAT TGCCGAAACC CGGTGAACCT	
	V A G T Y M E T C F G G K G A N Q C V A A A K L G A S T V L	Ribose-Bindestelle (124-165)
	0091 GTCCCGGAA CGTACATGGA GACCTGTTTC GGTGGCAAGG GAGCCAATCA GTGTGTGGA GCTGCCAAT TGCGGGCCTC CACCGTCTCG	
	V A K L S K D E S G D D Y L N H L Q Q H E V D V T H V Q Q V	
	0181 GTCCCAAGT TGGGCAAGGA CGAATCGGGC GATGACTACC TAAACCACCT GCAACAGCAC GAGGTTGATG TGACGCAGCT CCAGCAGGTG	
	E N N P T G M S E I A V S E N G D Q Y K I N V A G A N V F L	
	0271 GAGAACATC CCACGGGCAT GAGTGAATC GCGGTTTCTG AGAATGGAGA TCAGTACAAG ATCAACGTGG CTGGTGCAG TGTATTCTC	Primer Teil 2 forward (378-407)
	T A K D V T R A K K S F Q D A K V L L C Q L E T D M N A T M	
	0361 ACGGCCAAGG ATGTGACCG GGCTAAGAAG TCCTTTCAGG ATGCGAAGGT GCTTCTCTGC CAACTGGAAA CGGATATGAA TGCCACCATG	Deletionsbereich (498-500)
	C A L R Q F K G V S L L H M S P M R K D I P N A M I G L P T	
	0451 TGTGCGTTGC GTACATTCAA GGGGGTTTCC CTGCTCCACA TGTGCGCATG CGAAAAGATA TTCCAAATGC CATGATTGGC TTGCGCTACTA	
	F W L R I K R Q L P T I P I W K K C I P L I R R E K Q L K L	
	0541 TTCTGGTTGC GAATCAAGAG GGCAGTGCAC ACCTAACCGA TATGGAAGAA GTGTTAACCC CTGATCAGGC GCGAAAAGCA GCTGAAACTC	
	L S Q R E P R A I S L P W A S K E P F T C P R R A K I C A P	
	0631 TTATGCAAAA GGGAGCCAAAG AGCGTGATCA TTACCATGGG CGAGCAAGGA GCCGTTTACA TGTCCAAGAA GAGCAAAGAT ATGTGCACCC	ATP-Bindestelle (756-797)
	M C P F P M C R T W F I E R V P V M F L W A A W P I T I L D	
	0721 ATGTGCCCCG CTCGATGTG CCGCACTTGG CCGATCCCTC GGGTGCCGGT GATGCGTTTA TGGGCAGCTT GGCCTATCAC ATAGCTCGAT	Primer Teil 2 reverse (861-881)
	F P N C P Q N I I S V R H T P R P P A A A A L S Q V F	
	0811 TTCCCAAAC GTCCACAGAA CATCATATCA GTGCGGCACA CTCCTGCGCC GCCTACTCCA TGGGCGCCG CGGCACCTAG CCAAGTTTTT	
	R A R K A P K V T Y A I R R P R L V S F H L L V R N M K M I	
	0901 CGGGCAAGGA AAGCGCCAAA AGTGACCTAT GCTATTGAC GCCACGTTT AGTGTCTATC CACCTTCTAG TCCGCAAGT GAAGATGATA	
	I W I Q R R H R L Q W I S L R P K K H T P K R K L W K N R K	
	0991 ATATGGTAAC AAAGACGCCA CCGCTTCAA TGGTAGTCCC TACGCCCGAA GAAGCACACT CCAAAAAGGA AGTTGTGGA GAACCGCAA	
	N L H L L H R R I R L W K H L H Q R P P R N L R K Q W K P P	
	1081 AACCTGCACC TCCTCCACC GAGGATCCGG TTGTGAAGC ACCTCCACCA ACGACCTCCG AGGAACCTCC GAAAGCAGT GAAACCTCCA	
	N L Q S L R P L M N L Q S L R R P C I K E L I W P W R E	
	1171 ATGAACCTCC AAGCCTGCG GAGACCACTG ATGAACCTCC AAGCCTGCG GAGACCGCAG ATCAAGCTCC TGTGAARCC GTGAGACTG	
	L M S H L P T K ?	
	1261 CTAATGAGC ACCTGCCAAC AAAGCA	

Abbildung 44: Der Vergleich zwischen der Originalsequenz von D-Rbks<sup>33E</sup> mit der Sequenz von D-Rbks<sup>bubbles33E</sup>. Dargestellt sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen und die Lage der beiden Bindestellen von Ribose und ATP. Die Zahlen in den Klammern beziehen sich auf die Nukleotidabfolge. Ebenso sind die verwendeten Primer für den mutierten Bereich eingezeichnet. Die Originalsequenz in (A) zeigt die deletierte Base, während in der veränderten Sequenz in (B) die beiden betroffenen Codons dargestellt sind. Der Pfeilkopf in (B) markiert das resultierende Stopp-Codon in der Mutante.



### A.3 Tabelle der Proteine vom Drosophila-Proteom mit EF-Hand Domänen

Name des Proteins	Domänenstruktur	Datenbank-Informationen (flybase.org)	Expressionsmuster (www.fruitfly.org/cgi-bin/ex/insitu.pl)
CG13830	2x EFh, 1x TY, 1x Kazal, 1x CC	Interaktionspartner: u.a. Muscle LIM protein at 84B	-
CG17493	4x EFh	Maus-Ortholog: Centrin-1; Interaktionspartner: u.a. Arp1 und $\beta$ Tub85D	maternale Komponente
Myosin-2 essential light chain (CG3201)	3x EFh	'Myosin heavy chain'-Bindung; Maus-Ortholog: Myl6b-201; Interaktionspartner: u.a. $\alpha$ -Aktinin, WupA, Tm2, Tropomodulin	-
Epidermal growth factor receptor pathway substrate clone 15 (CG16932)	8 Repräsentationsformen; 0-2x EH, 1-4x EFh, 1x CC	Synaptische Vesikel-Endozytose; Maus-Ortholog: Eps15l1-201; Interaktionspartner: u.a. Abl, Egfr, Numb	-
Supercoiling factor (CG9148)	4x EFh	DNA-Topoisomerase-Aktivität; Maus-Ortholog: Crocalbin	viszerale Muskelvorläufergewebe, Garlandzellen
CG11638	4x EFh	nur sehr schwach im Embryo exprimiert; Interaktionspartner: u.a. Sickie (Apoptose)	-
Frequenin 2 (CG5907)	3x EFh	Entwicklung neuromuskulärer Verbindungen; Interaktionspartner: u.a. Four wheel drive (Meiose)	-
CG14362	2x EFh	nicht im Embryo exprimiert; Interaktionspartner: Vacuolar $H^{+}$ -ATPase44kD C Untereinheit	-
Sarcoplasmic calcium-binding protein (CG1435)	3x EFh	Interaktionspartner: u.a. Cyclin G (cyclin-abhängige Protein-Kinase-Regulator-Aktivität)	starke maternale Komponente, einwanderndes Mesoderm, Ektoderm
Aralar1 (CG2139)	3x EFh	mitochondrialer Transport; Maus-Ortholog: Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1; Interaktionspartner: u.a. Diminutiv (Zellgrößen-Regulator)	schwache maternale Komponente, schwach im späten Darm
CG17770	3x EFh	nicht im Embryo exprimiert	-

Calcium-binding protein E63-1 (CG15855)	4x EFh	Autophagischer Zelltod; nicht im Embryo exprimiert; Interaktionspartner: u.a. CalcineurinA1 (Neurotransmitter-Sekretion)	-
CG9236	3x EFh	Regulator von Serin/Threonin-Phosphatasen; Maus-Ortholog: KIP-2; Interaktionspartner: u.a. Nautilus	-
Mitochondrial Rho GTPase (Miro, CG5410)	kleine GTPase, 2x EFh, 1x TM	Synaptischer Vesikeltransport, Zytoskelett-Mikrotubuli-Organisation; Maus-Ortholog: Miro-1); Interaktionspartner: u.a. Cdc42	schwach im Endoderm-Vorläufergewebe
Androcam (And, CG17769)	4x EFh	Interaktionspartner: u.a. diverse Aktine und Arp2	-
Methuselah-like 7 (CG7476)	3x EFh	G-Protein-gekoppelter Rezeptor-Signalweg; Determination der adulten Lebensspanne; nicht im Embryo exprimiert	schwache maternale Komponente
CG17765	3x EFh	Maus-Ortholog: PEF-Protein mit einer langen N-terminalen hydrophoben Domäne	-
CG9406	2x EFh	nicht im Embryo exprimiert	-
Troponin C (TpnC41C, CG2981)	4x EFh	Interaktionspartner: u.a. Aktin42A	
CG5024	4x EFh	Interaktionspartner: u.a. ALG-2 interagierendes Protein X (Aktin-Zytoskelett-Organisation)	-
Troponin C (TpnC41F, CG12408)	4x EFh	Interaktionspartner: u.a. Aktin42A	-
CG31216	2x EFh	Determination der adulten Lebensspanne; Regulator von oxidativen Stress; Interaktionspartner: Nervous wreck (Synapsenwachstums-Regulation)	Sensorisches Nervensystem - Vorläufergewebe

Calbindin-32 (Cbp53E, CG6702)	5x EFh	zelluläre Kalzium-Homöostase; Maus-Ortholog: Calretinin	schwach im späten Mitteldarm, ventraler Nervenstrang, sensorisches System, embryonales Gehirn
Dynamin associated protein 160 (CG1099)	4 Repräsentationsformen; 0-2x EH, 1-2x EFh, 4x SH3, 2x CC	Synaptische Vesikel-Endocytose; Maus-Ortholog: Intersectin-2; Interaktionspartner: u.a. Akt1, Cdc42, Wasp	maternale Komponente, spät im ZNS
CG4704	2x EFh	nicht im Embryo exprimiert	-
CG31802	4x EFh	Interaktionspartner: u.a. Smaug (Translationsregulator)	-
Shot gun (CG18076)	6x Spec, 2x EFh, 1x Gas2	Negative Regulation der Mikrotubuli-Depolymerisierung; an Muskel-Anheftungsstellen exprimiert; Maus-Ortholog: Dystonin; Interaktionspartner: u.a. Slit, Drk	-
Dual oxidase (CG3131)	6x TM, 3x EFh	Abwehrantwort auf Bakterien; Immunsystem; Maus-Ortholog: Dual Oxidase 2	-
CG30378	3x EFh	-	-
NADPH oxidase (Nox, CG3896)	4x EFh, 5x TM	Oxido-Reduktase-Aktivität; Maus-Ortholog: NADPH-Oxidase	-
Rhomboid-4 (Rho-4, CG1697)	7x TM, 2x EFh	Serin-Typ-Peptidase; Interaktionspartner: u.a. Lark (Aktin-Zytoskelett)	-
Fkbp13 (CG9847)	2x EFh	Isomerase-Aktivität; Maus-Ortholog: Rotamase	Kopfmesoderm-Vorläufergewebe, Plasmatozyten, spät in der Epidermis
Troponin C (TpnC73F, CG7930)	4x EFh	Interaktionspartner: u.a. Aktin42A, Aktin5C, Calcineurin B	Ab Stadium 13 im Mesoderm
RdgC (CG6571)	1x IQ, 1x PP2Ac, 3x EFh	Thermotaxis; nicht im Embryo exprimiert; Maus-Ortholog: Serine/threonine-protein phosphatase with EF-hands 1; Interaktionspartner: u.a. Calmodulin und Shibre	Bolwig-Organ
CG13898	3x EFh	Interaktionspartner: u.a. Cdc2c (ATP-Bindung)	-

$\alpha$ -Actinin (CG4376)	2x CH, 4x Spec, 2x EFh	Aktin-Zytoskelett-Reorganisation; Maus-Ortholog: $\alpha$ -actinin-1; Interaktionspartner: u.a. Calpain A, Calpain B, Dynamitin, Pkd2, TM2	Kopf-, Rumpf- und viszerales Muskelvorläufergewebe, spätere viszerale und somatische Muskeln
CG31345	3x EFh	Phagocytose, Maus-Ortholog: Calcyphosin-ähnliches Protein	-
Ethanol sensitive with low memory (Elm, CG2185)	2x EFh	Maus-Ortholog: Calcium-binding protein p22	-
Solwind (Sowi, CG15178)	2x EFh	nicht im Embryo exprimiert; Interaktionspartner: u.a. Vacuolar $H^+$ -ATPase 44kD C Untereinheit	-
Sarcoplasmic calcium-binding protein 2 (CG14904)	3x EFh	GTPase-Aktivität	-
CG10641	2x EFh	Maus-Ortholog: Swiprosin-1	somatisches und viszerales Muskelvorläufergewebe, embryonale Muskeln
Calcium-binding mitochondrial protein Anon-60Da (CG4589)	3x CC, 1x TM, 2x EFh	Maus-Ortholog: Leucin-Zipper-EF-Hand-containing transmembrane protein 1; Interaktionspartner: u.a. Mastermind (asymmetrische Zellteilung)	frühes Gap-Gen-Muster, ventrales Ektoderm-Vorläufergewebe
Spectrin $\alpha$ chain (CG1977)	2 Repräsentationsformen; 20-21x Spec, 2x EFh, 0-1x SH3	Regulation der Synapsen-Organisation; Maus-Ortholog: Spectrin $\alpha$ chain; Interaktionspartner: u.a. Abi, Calpain A, Calpain B, diverse Aktine, $\beta$ 3-Tubulin	-
Calpain-A (CG7563)	2x EFh, Calpain_III, CysPc	Phagocytose; Interaktionspartner: u.a. $\alpha$ -Actinin, $\alpha$ - und $\beta$ -Spectrin, Slit	dorsales und ventrales Ektoderm-Vorläufergewebe
Cyt-b5 (CG2140)	2x EFh	Maus-Ortholog: Cytochrom-b5	dorsales und ventrales Ektoderm-Vorläufergewebe, Endoderm-Vorläufergewebe
RE14813 (TpnC73F, CG7930)	2x EFh	Interaktionspartner: u.a. Aktin42A, Aktin5C, Calcineurin B	Embryonale Muskeln

CG5890	3x EFh	nicht im Embryo exprimiert; Maus-Ortholog: KChIP1	-
CG8526	2x EFh	Lyso-Phospholipase-Aktivität; Interaktionspartner: diverse $\alpha$ - und $\beta$ -Tubuline	Kopf- und Rumpf-Mesoderm-Vorläufergewebe, ventraler Nervenstrang
CG11041	2x EFh	nicht im Embryo exprimiert	-
CG11105	2x	-	-
CalpainB (CG8107)	CysPc, Calpain III, 2xEFh	Proteolyse; Maus-Ortholog: Calpain-9; Interaktionspartner: u.a. $\alpha$ -Aktinin, Msp-300, $\alpha$ - und $\beta$ -Spektrin, Slit	maternale Komponente, Oesophagus-, und Pharynxmuskeln, schwach in den somatischen Muskeln
CG8334	2x EFh, 1x DUSP	Ubiquitin-spezifische Protease-Aktivität; Maus-Ortholog: Ubiquitin specific protease 32; Interaktionspartner: u.a. Garz (GEF), Slp1/2 (Transkriptionsregulation)	-
CG31475	3x EFh, 1x TM	Maus-Ortholog: 45 kDa calcium-binding protein Precursor	-
Troponin C at 25D (CG6514)	4x EFh	-	-
Myosin regulatory light chain, nonmuscle; Spagetti squash (Sqh, CG3595)	2x EFh	Zytokinese, Aktin-Zytoskelett-Organisation; Maus-Ortholog: Myosin regulatory light polypeptide 9; Interaktionspartner: u.a. Aktin5C und Aktin42A	-
CG15177	2x EFh	-	-
CG4662	2x EFh	Maus-Ortholog: EF-hand domain-containing family member A2	-
CG31960	4x EFh	-	-
Scp1 (CG15848)	3x EFh	Interaktionspartner: u.a. Poxmeso (Transkriptionsregulation) und Pericardin (Herzentwicklung)	-
Neurocalcin (CG7641)	3x EFh	Negative Regulation von Phosphorylierungen; Maus-Ortholog: Neurocalcin- $\delta$	-
CG11165	4x EFh	-	-
CG13526	3x EFh	-	-

CG10126	3x EFh	nicht im Embryo exprimiert	'Posterior Spiracles'
Calmodulin (CG8472)	4x EFh	Myosin-Heavy-Chain-Bindung; Maus-Ortholog: Calmodulin; Interaktionspartner: u.a. Arp2; Dynamitin, Nautilus, Zipper	starke maternale Komponente, Rumpf-Mesoderm-Vorläufergewebe, ventraler Nervenstrang, Keimzellen und Gonaden, sensorische Komplexe
Troponin C (TnC47D, CG9073)	4x EFh	Interaktionspartner: Aktin42A, Aktin5C, CalcineurinB	-
CG31650	5x EFh	Maus-Ortholog: Reticulocalbin-2 Precursor	-
Calcineurin subunit B (CG11217)	4x EFh	Sarkomer-Organisation; Maus-Ortholog: Calcineurin subunit B type 1; Interaktionspartner: u.a. Mhc, Calmodulin, Amx (Mesoderm-Entwicklung)	Mitteldarm-Vorläufergewebe, sehr schwach in den Malpighischen Gefäßen
CG32103	4x EFh	Transmembran-Transport-Aktivität; Maus-Ortholog: Calcium-binding mitochondrial carrier protein; Interaktionspartner: u.a. Abi	-
Diacylglycerol kinase 1 (CG34361)	2x EFh, 2x C1, 1x DAGKc, 1x CC, 1x DAGKa	Diacylglycerol-Kinase-Aktivität; Maus-Ortholog: Diacylglycerol kinase $\alpha$	-
Magu (CG2264)	1x Kazal, 2x Ty, 2x EFh	Determination der Lebensspanne; Maus-Ortholog: SPARC-related modular calcium-binding protein 2; Interaktionspartner: Slam (Keimzell-Wanderung)	-
CG2256	1x CC, 2x EFh	Interaktionspartner: u.a. CDk5 (Neurotransmitter-Sekretion)	-
CG4495	2x EFh	Maus-Ortholog: Calcium-binding atopy-related autoantigen 1,	-
Apoptosis-linked gene-2 (CG40410)	4x EFh	Positive Regulation der JNK-Kaskade	-

Erklärung zur Tabelle: (siehe dazu auch A.2.1, A. 2.2 und <http://www.ebi.ac.uk/interpro/>)

EFh: EF-Hand-Domäne; Kalzium-Bindedomäne.

TY: Thyroglobulin-Domäne; Inhibitoren von Cystein-Proteasen und Bindepertner von Heparin.

Kazal: Kazal-Typ Serin-Protease-Inhibitoren .

EH: Epsin15-Homologie-Domäne; Ein Paar von EF-Hand-Domänen, welche Asn-Pro-Phe-Sequenzen erkennen.

kleine GTPase: Ras-ähnliche kleine GTPase der ARF-, RAB und RAS-Unterfamilie.

Spec: Spektrin-Wiederholungen in vielen Zytoskelett-Proteinen, u.a.  $\alpha$ - und  $\beta$ -Spektrin,  $\alpha$ -Aktinin und Dystrophin.

Gas2: Growth-Arrest-Specific-Protein 2; meist in Assoziation mit Spektrin-Wiederholungen und EF-Hand-Domänen vorhanden.

IQ: Calmodulin-Bindedomäne mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindestellen.

PP2AC: Protein-Phosphatase-2A-Homologie-Domäne; eine katalytische Domäne in Serin/Threonin-Phosphatasen.

CH: Calponin-Homologie-Domäne; eine Aktin-Binde-Domäne, oft in Spektrin-ähnlichen Proteinen zur Verknüpfung von Aktin-Filamenten in Netzwerke.

Calpain III: Calpain-Peptidase-spezifische-Domäne. Involviert in vielen  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Prozesse

CysPc: Calpain-ähnliche Thiol-Protease-Domäne;  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte neutrale Protease-Domäne.

DUSP: Domäne in Ubiquitin-spezifischen Proteasen.

DAGKc: Diacylglycerol-Kinase-Katalytische-Domäne;

DAGKa: Diacylglycerol-Kinase-Zusatz-Domäne; ist verknüpft an die Anwesenheit von DAGKc

C1: Proteinkinase C-konservierte Region 1-Domäne mit vielen Cysteinen; oft Bindung von Phorbol-Estern und Diacylglycerol oder RasGTP.

## A.4 Abkürzungen

AK – Adenosinkinase

AP – Anterior-Posterior

ADP – Adenosindiphosphat

AMP – Adenosinmonophosphat

ARP – Aktin-related protein (Aktin-verwandtes Protein)

ATP – Adenosintriphosphat

CRAC –  $\text{Ca}^{2+}$ -Release-Activated  $\text{Ca}^{2+}$ -Current (ein durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aktivierter  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom)

CVM – Caudal Visceral Mesoderm (Kaudal-viszerales Mesoderm)

DAB – Diaminobenzidintetrahydrochlorid

DNA – Desoxyribonukleinsäure

EMS – Ethylmethansulfonat

ER – Endoplasmatisches Retikulum

FC – Founder Cell (Gründerzelle)

FCM – Fusion Competent Myoblast (Fusionskompetente Myoblaste)

FGF – Fibroblast Growth Factor (Fibroblasten-Wachstumsfaktor)

FuRMAS – Fusion Restricted Myogenic Adhesive Structure

GEF – Guanine Exchange Factor (Guanin-Austausch-Faktor)

GZ – Garland-Zellen

HRP – Horse Radish Peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)

MG – Molekulargewicht

pI – Isoelektrischer Punkt

PM – Plasmamembran

PRPP – Phosphoribosyl-5-Pyrophosphat

RBKS/RK – Ribokinase

RNA – Ribonukleinsäuren

SERCA - Sarco(endo)plasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase

SR – Sarkoplasmatisches Retikulum

TGF – Transforming Growth Factor (transformierender Wachstumsfaktor)

TRP – Transient Receptor Potential (transientes Rezeptorpotential)

TVM – Trunk Visceral Mesoderm (Rumpf-viszerales Mesoderm)

## A.5 verwendete Konstrukte und Herstellung

<b>Gen</b>	<b>Vektor</b>	<b>Insert-Informationen</b>
CG17010	pUAS <sup>t</sup> -HA	1283 Nukleotide ; BglIII, KpnI
CG4983	pUAS <sup>t</sup> -HA	1101 Nukleotide , BglIII, XhoI
Arp1	pUAS <sup>t</sup> -HA	1125 Nukleotide , EcoRI, XhoI
bruno-2	pUAS <sup>t</sup> -HA	1764 Nukleotide , BglIII, KpnI
CG31862	pUAS <sup>t</sup> -HA	546 Nukleotide, EcoRI, XhoI
CG31763	pUAS <sup>t</sup> -HA	402 Nukleotide , EcoRI, XhoI



## B Literaturverzeichnis

- Aaron, B., Oikawa, K., Reithmeier, R., & Sykes, B. 1984. Characterization of skeletal muscle Calsequestrin by  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy. *J. Biol. Chem.*, **259**, 11876–11881.
- Abbraccio, M., Boeynaems, J., Barnard, E., Boyer, J., & et al. 2003. Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y<sub>14</sub> receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. *Trends Pharm. Sci.*, **24**, 52–55.
- Abmayr, S., Balagopalan, L., Galetta, B., & Hong, S. 2005. *Myogenesis and Muscle Development*. In Comprehensive Molecular Insect Science. Vol. 2.
- Abmayr, S., Zhuang, S., & Geisbrecht, E. 2008. Myoblast fusion in *Drosophila*. *Methods Mol. Biol.*, **475**, 75–97.
- Adams, M., Celniker, S., & et al. 2000. The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, **287**, 2185–2195.
- Aggarwal, S., & King, R. 1967. The ultrastructure of the wreath cells of *Drosophila melanogaster* larvae. *Protoplasma*, **63**, 343–352.
- Agranoff, B., & Brady, R. 1956. Purification and properties of calf liver ribokinase. *J. Biol. Chem.*, **219**, 221–229.
- Anderson, A., & Cooper, R. 1969. The significance of ribokinase for ribose utilization by *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, **177**, 163–165.
- Andersson, E., & Mowbray, S. 2002. Activation of Ribokinase by monovalent cations. *J. Mol. Biol.*, **315**, 409–419.
- Araya, R., Riquelme, M., Brandan, E., & Saez, J. 2004. The formation of skeletal muscle myotubes requires functional membrane receptors activated by extracellular ATP. *Brain Res. Rev.*, **47**, 174–188.
- Artero, R., Castanon, I., & Baylies, M. 2001. The immunoglobulin-like protein Hibris functions as a dose-dependent regulator of myoblast fusion and is differentially controlled by Ras and Notch signaling. *Development*, **128**, 4251–4264.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidmann, J., Smith, J., & Struhl, K. 1993. *Current protocols in molecular biology*. John Wiley and Sons, New York.
- Azpiaz, N., & Frasch, M. 1993. *tinman* and *bagpipe*: two homeo box genes that determine cell fates in the dorsal mesoderm of *Drosophila*. *Gen. Dev.*, **7**, 1325–1340.
- Baba, Y., & Kurosaki, T. 2009. Physiological function and molecular basis of STIM1-mediated calcium entry in immune cells. *Imm. Reviews*, **231**, 174–188.
- Baba, Y., Hayashi, K., Fujii, Y., Mizushima, A., Watarai, H., Wakamori, M., Numaga, T., Mori, Y., Iino, M., Hikida, M., & Kurosaki, T. 2006. Coupling of STIM1 to store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry through its constitutive and inducible movement in the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 16704–16709.
- Banachewicz, W., Suplat, D., Krzeminski, P., Pomorski, P., & Baranska, J. 2005. P2 nucleotide receptors on C2C12 satellite cells. *Purinergic signalling*, **1**, 249–257.
- Bate, M. 1990. The embryonic development of larval muscles in *Drosophila*. *Development*, **110**, 791–804.
- Bate, M., Rushton, E., & Frasch, M. 1993. A dual requirement for neurogenic genes in *Drosophila* myogenesis. *Development*, **Suppl.**, 149–161.
- Bate, Michael. 1993. *The Mesoderm and Its Derivatives*. In The Development of *Drosophila melanogaster*. Vol. 2.
- Baylies, M., & Bate, M. 1996. *twist*: A myogenic switch in *Drosophila*. *Science*, **272**, 1481–1483.

- Baylies, M., Martinez-Arias, A., & Bate, M. 1995. *wingless* is required for the formation of a subset of muscle founder cells during *Drosophila* embryogenesis. *Development*, **121**, 3829–3837.
- Baylies, M., Bate, M., & Ruiz-Gomez, M. 1998. Myogenesis: A view from *Drosophila*. *Cell*, **93**, 921–927.
- Beckett, K., Rochlin, K., Duan, H., Nguyen, H., & Baylies, M. 2008. Expression and functional analysis of a novel fusion competent myoblast specific GAL4 driver. *Gene Expr. Patt.*, **8**, 87–91.
- Berger, S., Schäfer, G., Kesper, D., Holz, A., Eriksson, T., Palmer, R., Beck, L., Klämbt, C., Renkawitz-Pohl, R., & Önel, S. 2008. WASP and SCAR have distinct roles in activating the Arp2/3 complex during myoblast fusion. *J. Cell Sci.*, **121**, 1303–1313.
- Berridge, M., Lipp, P., & Bootman, M. 2000. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **1**, 11–21.
- Bienz, M. 1994. Homeotic genes and positional signalling in the *Drosophila* viscera. *Trends Genet.*, **10**, 22–26.
- Bienz, M. 1997. Endoderm induction in *Drosophila* the nuclear targets of the inducing signals. *Curr. Opin. Gen. Dev.*, **7**, 683–688.
- Bienz, M., & Tremml, G. 1988. Domain of *Ultrabithorax* expression in *Drosophila* visceral mesoderm from autoregulation and exclusion. *Nature*, **333**, 576–578.
- Birnboim, H., & Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.*, **7**, 1513–1523.
- Birney, E., Kumar, S., & Krainer, A. 1993. Analysis of the RNA-recognition motif and RS and RGG domains: conservation in metazoan pre-mRNA splicing factors. *Nucl. Acids Res.*, 5803–5816.
- Boczkowska, M., Rebowski, G., Petoukhov, M., Hayes, D., Svergun, D., & Dominguez, R. 2008. X-Ray scattering study of activated Arp2/3 complex with bound Actin-WCA. *Structure*, **16**, 695–704.
- Bodmer, R. 1993. The gene *tinman* is required for specification of the heart and visceral muscles in *Drosophila*. *Development*, **118**, 719–729.
- Bork, P., Sander, C., & Valencia, A. 1993. Convergent evolution of similar enzymatic function of different protein folds: the hexokinase, ribokinase and galactokinase families of sugar kinases. *Protein Sci.*, **2**, 31–40.
- Bour, B., Chakravarti, M., West, J., & Abmayr, S. 2000. *Drosophila* SNS, a member of the immunoglobulin superfamily that is essential for myoblast fusion. *Gen. Dev.*, **14**, 1498–1511.
- Brand, A., & Perrimon, N. 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, **118**, 401–415.
- Broihier, M., Moore, L., van Doren, M., Newman, S., & Lehmann, R. 1998. Zfh-1 is required for germ cell migration and gonadal mesoderm development in *Drosophila*. *Development*, **125**, 655–666.
- Calahan, M. 2009. STIMulating store-operated Ca<sup>2+</sup> entry. *Nat. Cell Biol.*, **11**, 669–677.
- Campos-Ortega, J., & Hartenstein, V. 1997. *The embryonic development of Drosophila melanogaster*. Springer Verlag, Berlin.
- Carmena, A., Bate, M., & Jimenez, F. 1995. *lethal of scute*, a proneural gene, participates in the specification of muscle progenitors during *Drosophila* embryogenesis. *Gen. Dev.*, **9**, 2373–2383.
- Carmena, A., Gisselbrecht, S., Harrison, J., Jimenez, F., & Michelson, A. 1998a. Combinatorial signaling codes for the progressive determination of cell fates in the *Drosophila* embryonic mesoderm. *Gen. Dev.*, **12**, 3910–3922.
- Carmena, A., Murugasu-Oei, B., Menon, D., Jimenez, F., & Cia, W. 1998b. *inscuteable* and *numb* mediate asymmetric muscle progenitor cell divisions during *Drosophila* myogenesis. *Gen. Dev.*, **12**, 304–315.

- Carrasco-Rando, M., & Ruiz-Gomez, M. 2008. Mind bomb 2, a founder myoblast-specific protein, regulates myoblast fusion and muscle stability. *Development*, **135**, 849–857.
- Casas-Tinto, S., Gomez-Velazquez, M., Granadino, B., & Fernandez-Funez, P. 2008. FoxK mediates TGF-beta signalling during midgut differentiation in flies. *J. Cell Biol.*, **183**, 1049–1060.
- Chanana, B., Graf, R., Koledachkina, T., Pflanz, R., & Vorbrüggen, G. 2007. alphaPS2 integrin-mediated muscle attachment in *Drosophila* requires the ECM protein Thrombospondin. *Mech. Dev.*, **124**, 463–475.
- Chen, E., & Olson, E. 2001. Antisocial, an intracellular adaptor protein, is required for myoblast fusion in *Drosophila*. *Dev. Cell*, **1**, 705–715.
- Chen, E., Pryce, B., Tzeng, J., Gonzalez, G., & Olson, E. 2003. Control of myoblast fusion by a Guanine nucleotide exchange factor, Loner, and its effector ARF6. *Cell*, **114**, 751–762.
- Choo, H., Kim, B., Kwon, O., Lee, C., Choi, J., & Ko, Y. 2008. Secretion of adenylate kinase 1 is required for extracellular ATP synthesis in C2C12 myotubes. *Exp. Mod. Med.*, **40**, 220–228.
- Chuvikovsky, D., Esipov, R., Skoblow, Y., Chupova, L., Muravyova, T., Miroshnikov, A., Lapinokli, S., & Mikhailopoulo, I. 2006. Ribokinase from *E. coli*: expression, purification, and substrate specificity. *Bioorg. Med. Chem.*, **14**, 6327–6332.
- Cope, J., Whisstock, J., Rayment, I., & Kendrick-Jones, J. 1996. Conservation within the myosin motor domain: implications for structure and function. *Structure*, **4**, 969–987.
- Crossley, A. 1985. *Nephrocytes and pericardial cells*. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*.
- Crouse, J., & Amorese, D. 1987. Ethanol precipitation: ammonium acetate as an alternative to sodium acetate. *Focus*, **9**, 3–5.
- Crozatier, M., & Vincent, A. 1999. Requirement for the *Drosophila* COE transcription factor Collier in formation of an embryonic muscle: transcriptional response to notch signaling. *Development*, **126**, 1495–1504.
- DiCera, E. 2006. A structural perspective on enzymes activated by monovalent cations. *J. Biol. Chem.*, **281**, 1205–1308.
- Dietzl, G., Chen, D., Schnorrer, F., Su, K., Barinova, Y., Fellner, M., & et al. 2007. A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature*, **448**, 151–157.
- Doberstein, S., Fetter, R., Mehta, A., & Goodman, C. 1997. Genetic analysis of myoblast fusion: *blown fuse* is required for progression beyond the prefusion complex. *J. Cell Biol.*, **136**, 1249–1261.
- Dohrmann, C., Azpiazu, N., & Frasch, M. 1990. A new *Drosophila* homeobox gene is expressed in mesodermal precursor cells of distinct muscles during embryogenesis. *Gen. Dev.*, **4**, 2098–2111.
- Duan, H., Skeath, J., & Nguyen, H. 2001. *Drosophila* *Lame duck*, a novel member of the Gli superfamily, acts as a key regulator of myogenesis by controlling fusion-competent myoblast development. *Development*, **128**, 4489–4500.
- Dworak, H., Charles, M., Pellerano, L., & Sink, H. 2001. Characterization of *Drosophila hibris*, a gene related to human nephrin. *Development*, **128**, 4265–4276.
- Dyer, N., Rebollo, E., Dominguez, P., Elkhatib, N., Chavrier, P., Daviet, L., Gonzalez, C., & Gonzalez-Gaitan, M. 2007. Spermatocyte cytokinesis requires rapid membrane addition mediated by ARF6 on central spindle recycling endosomes. *Development*, **134**, 4437–4447.
- Ebashi, S., Endo, M., & Otsuki, I. 1969. Control of muscle contraction. *Q. Rev. Biophys.*, **2**, 351–384.
- Englund, C., Loren, C., Grabbe, C., Varshney, G., Deleuil, F., Hallberg, B., & Palmer, R. 2003. Jeb signals through the Alk receptor tyrosine kinase to drive visceral muscle fusion. *Nature*, **425**, 512–516.

- Erickson, M., Galletta, B., & Abmayr, S. 1997. *Drosophila myoblast city* encodes a conserved protein that is essential for myoblast fusion, dorsal closure and cytoskeletal organization. *J. Cell Biol.*, **138**, 589–603.
- Estrada, B., Choe, S., Gisselbrecht, S., Michaud, S., Raj, L., Busser, B., Halfon, M., Church, G., & Michelson, A. 2006. An integrated strategy for analyzing the unique developmental programs of different myoblast subtypes. *PLoS Genetics*, **2**, 160–171.
- Estrada, B., Maeland, A., Gisselbrecht, S., Bloor, J., Brown, N., & Michelson, A. 2007. The MARVEL domain protein, Singles Bar, is required for progression past the pre-fusion complex stage of myoblast fusion. *Dev. Biol.*, **307**, 328–339.
- Etienne-Manneville, S., & Hall, A. 2002. Rho GTPases in cell biology. *Nature*, **420**, 629–635.
- Fedoroff, O., Townson, S., Golovanov, A., Baron, M., & Avis, J. 2004. The structure and dynamics of tandem WW domains in a negative regulator of notch signaling, Suppressor of Deltex. *J. Biol. Chem.*, **279**, 34991–35000.
- Feske, S. 2007. Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nat. Rev. Immunol.*, **7**, 690–702.
- Finan, P., Shimizu, Y., Gout, I., Hsuan, J., Truong, O., Butcher, C., Bennett, P., Waterfield, M., & Kellie, S. 1994. An SH3 domain and proline-rich sequence mediate an interaction between two components of the phagocyte NADPH oxidase complex. *J. Biol. Chem.*, **269**, 13752–13755.
- Frankel, S., & Mooseker, M. 1996. The actin-related proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **8**, 30–37.
- Franzini-Armstrong, C., & Protasi, F. 1997. Ryanodine receptors of striated muscles: a complex channel capable of multiple interactions. *Physiol. Rev.*, **77**, 699–729.
- Frasch, M. 1995. Induction of visceral and cardiac mesoderm by ectodermal Dpp in the early *Drosophila* embryo. *Nature*, **374**, 464–467.
- Frasch, M., & Leptin, M. 2000. Merges and acquisitions: unequal partnerships in *Drosophila* myoblast fusion. *Cell*, **102**, 127–129.
- Furlong, E., Andersen, E., Null, B., White, K., & Scott, M. 2001. Patterns of gene expression during *Drosophila* mesoderm development. *Science*, **293**, 1629–1633.
- Galletta, B., Chakravarti, M., Banerjee, R., & Abmayr, S. 2004. SNS: adhesive properties, localization requirements and ectodomain dependence in S2 cells and embryonic myoblasts. *Mech. Dev.*, **121**, 1455–1468.
- Gao, Z., Ruden, D., & Lu, X. 2003. PKD2 cation channel is required for directional sperm movement and male fertility. *Curr. Biol.*, **13**, 2175–2178.
- Gassen, H., & Schrimpf, G. 1999. *Gentechnische Methoden*. Spektrum Akademischer Verlag.
- Gaul, U., Seifert, E., Schuh, R., & Jäckle, H. 1987. Analysis of *Krüppel* protein distribution during early *Drosophila* development reveals posttranscriptional regulation. *Cell*, **50**, 639–647.
- Geisbrecht, E., Haralalka, S., Swanson, S., Florens, L., Washburn, M., & Abmayr, S. 2008. *Drosophila* ELMO/CED-12 interacts with Myoblast city to direct myoblast fusion and ommatidial organization. *Dev. Biol.*, **314**, 137–149.
- Georgias, C., Wasser, M., & Hinz, U. 1997. A basic-helix-loop-helix protein expressed in precursors of *Drosophila* longitudinal visceral muscles. *Mech. Dev.*, **69**, 115–124.
- Gibson, F., Walsh, J., Mburu, P., Varela, A., Brown, K., Antonio, M., Beisel, K., Steel, K., & Brown, S. 1995. A type VII myosin encoded by the mouse deafness gene *shaker-1*. *Nature*, **347**, 62–64.
- Giot, L., Bader, J., Brouwer, C., & et al. 2003. A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science*, **302**, 1727–1737.

- Gourine, A., Laudet, E., Dale, N., & Spyer, M. 2005. ATP is a mediator of chemosensory transduction in the central nervous system. *Nature*, **436**, 108–111.
- Guerin, C., & Kramer, S. 2009. Cytoskeletal remodeling during myotube assembly and guidance. *Comm. Integr. Biol.*, **2**, 452–457.
- Guo, M., Jan, L., & Jan, Y. 1996. Control of daughter cell fates during asymmetric cell division: Interaction of Numb and Notch. *Neuron*, **17**, 27–41.
- Haghnia, M., Cavalli, V., Shah, S., Schimmelpfeng, K., Brusch, R., Yang, G., Herrera, C.I., Pilling, A., & Goldstein, L. 2007. Dynactin is required for coordinated bidirectional motility, but not for Dynein membrane attachment. *Mol. Biol. Cell*, **18**, 2081–2089.
- Hakeda-Suzuki, S., Ng, J., Tzu, J., Dietzl, G., Sun, Y., Harms, M., Nardine, T., Luo, L., & Dickson, B. 2002. Rac function and regulation during *Drosophila* development. *Nature*, **416**, 438–442.
- Hao, W., & Gupta, R. 1996. Pentavalent ions dependency of mammalian adenosine kinase. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **38**, 889–899.
- Harley, H., Brook, D., Rundle, S., Crow, S., Reardon, W., Buckler, A., Harper, P., Housman, D., & Shaw, D. 1992. Expansion of an unstable DNA region and phenotypic variation in myotonic dystrophy. *Nature*, **355**, 545–546.
- Heizmann, C., & Hunziger, W. 1991. Intracellular calcium-binding proteins: more sites than insights. *Trends Biochem.*, **16**, 98–103.
- Holmgren, A. 1985. Thioredoxin. *Ann. Rev. Biochem.*, **54**, 237–71.
- Horsley, V., & Pavlath, G. 2004. Forming a multinucleated cell: molecules that regulate myoblast fusion. *Cells Tiss. Org.*, **176**, 67–78.
- Hoth, M., & Penner, R. 1992. Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature*, **355**, 353–356.
- Huang, G., Zeng, W., Kim, J., Yuan, J., Han, L., Muallem, S., & Worley, P. 2006. STIM1 carboxyl-terminus activates native SOC, ICRAC and TRPC1 channels. *Nat. Cell Biol.*, **8**, 1003–1010.
- Hummel, T., Schimmelpfeng, K., & Klämbt, C. 1999a. Commissure formation in the embryonic CNS of *Drosophila*. *Dev. Biol.*, **209**, 381–398.
- Hummel, T., Schimmelpfeng, K., & Klämbt, C. 1999b. Commissure formation in the embryonic CNS of *Drosophila*. *Development*, **126**, 771–779.
- Ikura, M. 1996. Calcium binding and conformational response in E-F hand proteins. *Trends Biochem.*, **21**, 14–17.
- Izard, J., & Kendall, D. 1994. Signal peptides: exquisitely designed transport promoters. *Mol. Microbiol.*, **13**, 765–773.
- Jagla, T., Bellard, F., Lutz, Y., Dretzen, G., Bellard, B., & Jagla, K. 1998. *ladybird* determines cell fate decisions during diversification of *Drosophila* somatic muscles. *Development*, **125**, 3699–3708.
- Jan, Y., & Jan, L. 1998. Asymmetric cell division. *Nature*, **392**, 775–778.
- Jani, K., & Schöck, F. 2007. Zasp is required for the assembly of functional integrin adhesion sites. *J. Cell Biol.*, **179**, 1583–1597.
- Janmey, P. 1994. Phosphoinositides and calcium as regulators of cellular actin assembly and disassembly. *Annu. Rev. Physiol.*, **56**, 169–191.
- Juhnke, H., Krems, B., Kötter, P., & Entian, K. 1996. Mutants that show increased sensitivity to hydrogen peroxide reveal an important role for the pentose phosphate pathway in protection of yeast against oxidative stress. *Mol. Gen. Genet.*, **252**, 456–464.

- Kabsch, W., & Holmes, K. 1995. The actin fold. *FASEB J.*, **9**, 167–174.
- Kania, M., Bonner, A., Duffy, J., & Gergen, P. 1990. The *Drosophila* segmentation gene *runt* encodes a novel nuclear regulatory protein that is also expressed in the developing nervous system. *Gen. Dev.*, **4**, 1701–1713.
- Kesper, D., Stute, C., Buttgereit, D., Kreisköther, N., Vishnu, S., Fischbach, K., & Renkawitz-Pohl, R. 2007. Myoblast fusion in *Drosophila melanogaster* is mediated through a fusion-restricted myogenic-adhesive structure (FuRMAS). *Dev. Dyn.*, **236**, 404–415.
- Kim, M., Lee, J., Ha, J., Kim, S., Kong, Y., Cho, Y., Baik, H., & Kang, I. 2002. ATP stimulates glucose transport through activation of P2 purinergic receptors in C2C12 skeletal muscle cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, **401**, 205–214.
- Kim, S., Shilagardi, K., Zhang, S., Hong, S., Sens, K., Bo, J., Gonzalez, G., & Chen, E. 2007. A critical function for the actin cytoskeleton in targeted exocytosis of prefusion vesicles during myoblast fusion. *Dev. Cell*, **12**, 571–586.
- Kinley, A., Weed, S., Weaver, A., Karginov, A., Bissonette, E., & Cooper, J. 2003. Cortactin interacts with WIP in regulating Arp2/3 activation and membrane protrusion. *Curr. Biol.*, **13**, 384–393.
- Klapper, R., Heuser, S., Strasser, T., & Janning, W. 2001. A new approach reveals syncytia within the visceral musculature of *Drosophila melanogaster*. *Development*, **128**, 2517–2524.
- Klapper, R., Stute, C., Schomaker, O., Strasser, T., Janning, W., Renkawitz-Pohl, R., & Holz, A. 2002. The formation of syncytia within the visceral musculature of the *Drosophila* midgut is dependent on *duf*, *sns* and *mbc*. *Mech. Dev.*, **110**, 85–96.
- Kocherlakotka, K., Wu, J., McDermott, J., & Abmayr, S. 2008. Analysis of the cell adhesion molecule sticks-and-stones reveals multiple redundant functional domains, protein-interaction motifs and phosphorylated tyrosines that direct myoblast fusion in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, **178**, 1371–83.
- Kosman, D., Small, S., & Reinitz, J. 1998. Rapid preparation of a panel of polyclonal antibodies to *Drosophila* segmentation proteins. *Dev. Genes Evol.*, **208**, 290–294.
- Koundakjian, E., Cowan, D., Hardy, R., & Becker, A. 2004. The Zuker collection: A resource for the analysis of autosomal gene function in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, **167**, 203–206.
- Kracklauer, M., Banks, S., Xie, X., Wu, Y., & Fischer, J. 2007. *Drosophila* *klaroid* encodes a SUN domain protein required for Klarsicht localization to the nuclear envelope and nuclear migration in the eye. *Fly*, **1**, 75–85.
- Kreisköther, N., Reichert, N., Buttgereit, D., Hartenstein, A., Fischbach, K., & Renkawitz-Pohl, R. 2006. *Drosophila* Rolling pebbles colocalises and putatively interacts with alpha-Actinin and the Sls isoform Zormin in the Z-discs of the sarcomere and with Dumbfounded/Kirre, Alpha-Actinin and Zormin in the terminal Z-discs. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **27**, 93–106.
- Lawrence, P., & Johnston, P. 1989. Pattern formation in the *Drosophila* embryo: allocation of cells to parasegments by *even-skipped* and *fushi tarazu*. *Development*, **105**, 761–767.
- Leiss, D., und A. Gasch und R. Mertz, U. Hinz, & Renkawitz-Pohl, R. 1988. beta3 tubulin expression characterizes the differentiating mesodermal germ layer during *Drosophila* embryogenesis. *Development*, **104**, 525–531.
- Lewis, R., & Calahan, M. 1989. Mitogen-induced oscillations of cytosolic Ca<sup>2+</sup> and transmembrane Ca<sup>2+</sup> current in human leukemic T cells. *Cell Regul.*, **1**, 99–112.
- Liou, J., Kim, M., Heo, W., Jones, J., Myers, J., Ferrell, J., & Meyer, T. 2005. STIM is a Ca<sup>2+</sup> sensor essential for Ca<sup>2+</sup>-store-depletion triggered Ca<sup>2+</sup> influx. *Curr. Biol.*, **15**, 1235–1241.

- Lopilato, J., Garwin, J., Emr, S., Silhavy, T., & Beckwith, J. 1984. D-Ribose metabolism in *Escherichia coli* K-12: Genetics, Regulation, and Transport. *J. Bacteriology*, **158**, 665–673.
- Loren, C., Englund, C., Hallberg, B., Hunter, T., & Palmer, R. 2003. A crucial role for the Anaplastic lymphoma kinase receptor tyrosine kinase in gut development in *Drosophila melanogaster*. *EMBO Rep.*, **4**, 781–786.
- Luo, L., Liao, J., Jan, L., & Jan, Y. 1994. Distinct morphogenetic functions of similar small GTPases: *Drosophila* Drac1 is involved in axonal outgrowth and myoblast fusion. *Gen. Dev.*, **8**, 1787–1802.
- Macias, M., Hyvönen, M., Baraldi, E., Schultz, J., Sudol, M., Saraste, M., & Oschkinat, H. 1996. Structure of the WW domain of a kinase-associated protein complexed with a proline-rich peptide. *Nature*, **382**, 646–649.
- MacLennan, D. 1990. Molecular tools to elucidate problems in excitation-contraction coupling. *Biophys. J.*, **58**, 1355–1365.
- Maj, M., & Gupta, R. 2001. The effect of inorganic phosphate on the activity of bacterial ribokinase. *J. Protein Chem.*, **20**, 139–144.
- Maj, M., Singh, B., & Gupta, R. 2000. The influence of inorganic phosphate on the activity of adenosine kinase. *Biochim. Biophys. Acta*, **1476**, 33–42.
- Maj, M., Singh, B., & Gupta, R. 2002. Pentavalent ions dependency is a conserved property of adenosine kinase from diverse sources: identification of a novel motif implicated in phosphate and magnesium ion binding and substrate inhibition. *Biochemistry*, **41**, 4059–4069.
- Marks, P., & Maxfield, F. 1990. Transient increases in cytosolic free calcium appear to be required for the migration of adherent human neutrophils. *J. Cell Biol.*, **110**, 43–52.
- Massarwa, R., Carmon, S., Shilo, B., & Schejter, E. 2007. WIP/WASp-based actin-polymerization machinery is essential for myoblast fusion in *Drosophila*. *Dev. Cell*, **12**, 557–569.
- Mathews, I., Erion, M., & Ealick, S. 1998. Structure of human adenosine kinase at 1.5 Å resolution. *Biochemistry*, **37**, 15607–15620.
- Matte, A., Tari, L., & Delbaere, L. 1998. How do kinases transfer phosphoryl groups. *Structure*, **6**, 413–419.
- Menon, S., & Chia, W. 2001. *Drosophila* Rolling pebbles: a multidomain protein required for myoblast fusion that recruits D-Titin in response to the myoblast attractant Dumbfounded. *Dev. Cell*, **1**, 691–703.
- Menon, S., Osman, Z., Chenchill, K., & Chia, W. 2005. A positive feedback loop between Dumbfounded and Rolling pebbles leads to myotube enlargement in *Drosophila*. *J. Cell Biol.*, **169**, 909–920.
- Meyer, R., & Aebi, U. 1990. Bundling of actin filaments by alpha-actinin depends on its molecular weight. *J. Cell Biol.*, **110**, 2013–2024.
- Michelson, A., Abmayr, S., Bate, M., Martinez-Arias, A., & Maniatis, T. 1990. Expression of a MyoD family member prefigures muscle pattern in *Drosophila* embryos. *Gen. Dev.*, **4**, 2086–2097.
- Michelson, A., Gisselbrecht, S., Zhou, Y., Baek, K., & Buff, E. 1998. Dual functions of the Heartless fibroblast growth factor receptor in development of the *Drosophila* embryonic mesoderm. *Dev. Gen.*, **22**, 212–229.
- Miyado, K. 2000. Requirement of CD9 on egg plasma membrane for fertilization. *Science*, **287**, 321–324.
- Moews, P., & Kretsinger, R. 1975. Refinement of the structure of carp muscle calcium-binding parvalbumin by model building and difference Fourier analysis. *J. Mol. Biol.*, **91**, 201–228.
- Mogilner, A., & Edelstein-Keshet, L. 2002. Regulation of actin dynamics in rapidly moving cells: a quantitative analysis. *Biophys. J.*, **83**, 1237–1258.
- Muller, J., Oma, Y., Vallar, L., Friederich, E., Poch, O., & Winsor, B. 2005. Sequence and comparative genomic analysis of actin-related proteins. *Mol. Biol. Cell*, **16**, 5736–5748.

- Neuhaus, H., & Emes, M. 2000. Nonphotosynthetic metabolism in plastids. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **51**, 111–140.
- Oenel, S., & Renkawitz-Pohl, R. 2009. FuRMAS: Triggering myoblast fusion in *Drosophila*. *Dev. Dyn.*, **238**, 1513–1525.
- Oenel, S., Dottermusch, C., Sickmann, A., Buttgerit, D., & Renkawitz-Pohl, R. 2010. *Role of the Actin Cytoskeleton within the FuRMAS during Drosophila myoblast fusion and first common players in vertebrates in: Cell Fusions: Regulation and Control*. Soringer Verlag 2010.
- Parducci, R., Cabrera, R., Baez, M., & Guixe, V. 2006. Evidence for a catalytic Mg<sup>2+</sup> ion and effect of phosphate on the activity of *Escherichia coli* phosphofructokinase-2: regulatory properties of a RK family member. *Biochemistry*, **45**, 9291–9299.
- Parekh, A., & Penner, R. 1997. Store depletion and calcium influx. *Physiol. Rev.*, **77**, 901–930.
- Parekh, A., & Putney, J. 2005. Store-operated calcium channels. *Physiol. Rev.*, **85**, 757–810.
- Park, J., & Gupta, R. 2008. Adenosine kinase and ribokinase - the RK family of proteins. *Cell. Mol. Life Sci.*, **65**, 2875–2896.
- Park, J., Singh, B., Maj, M., & Gupta, R. 2004. Phosphorylated derivatives that activate or inhibit mammalian adenosine kinase provide insights into the role of pentavalent ions in AK catalysis. *Protein J.*, **23**, 167–177.
- Park, J., Singh, B., & Gupta, R. 2006. Inhibition of adenosine kinase by phosphonate and bisphosphonate derivatives. *Mol. Cell. Biochem.*, **283**, 11–21.
- Park, J., van Koeven, P., Sing, B., & Gupta, R. 2007. Identification and characterization of human ribokinase and comparison of its properties with *E.coli* ribokinase and human adenosine kinase. *FEBS Lett.*, **581**, 3211–3216.
- Park, M., Yaich, L., & Bodmer, R. 1998. Mesodermal cell fate decisions in *Drosophila* are under the control of the lineage genes *numb*, *Notch* and *Sanpodo*. *Mech. Dev.*, **75**, 117–126.
- Patel, N., Snow, P., & Goodman, C. 1987. Characterization and cloning of FasciclinIII: A glycoprotein expressed on a subset of neurons and axon pathways in *Drosophila*. *Cell*, **48**, 975–988.
- Paululat, A., Burchard, S., & Renkawitz-Pohl, R. 1995. Fusion from myoblasts to myotubes is dependent on the *rolling stone* gene (*rost*) of *Drosophila*. *Development*, **121**, 2611–2620.
- Paululat, A., Breuer, S., & Renkawitz-Pohl, R. 1999. Determination and development of the larval muscle pattern in *Drosophila melanogaster*. *Cell Tiss. Res.*, 151–160.
- Periz, G., & Fortini, M. 1999. Ca<sup>2+</sup>-ATPase function is required for intracellular trafficking of the Notch receptor in *Drosophila*. *EMBO J.*, **18**, 5983–5993.
- Pollard, T. 1986. Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-Actin with the ends of actin filaments. *J. Cell Biol.*, **103**, 2747–2754.
- Pollard, T. 2007. Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **36**, 451–477.
- Pollard, T., Blanchoin, L., & Mullins, D. 2000. Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **29**, 545–576.
- Pores-Fernando, A., & Zweifach, A. 2009. Calcium influx and signaling in cytotoxic T-lymphocyte lytic granule exocytosis. *Imm. Rev.*, **231**, 160–173.
- Putney, J. 1990. Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium*, **11**, 611–624.
- Putney, J. 2005. Capacitative calcium entry: sensing the calcium stores. *J. Cell Biol.* 169, **169**, 381–382.



- Quintyne, N., Gill, S., Eckley, D., Credo, C., Compton, D., & Schroer, T. 1999. Dynactin is required for microtubule anchoring at centrosomes. *J. Cell Biol.*, **147**, 321–334.
- Ranganayakulu, G., Zhao, B., Dokidis, A., Molkentin, J., Olson, E., & Schulz, R. 1995. A series of mutations in the D-Mef2 transcription factor reveal multiple functions in larval and adult myogenesis in *Drosophila*. *Dev. Biol.*, **171**, 169–181.
- Rau, A., Buttgerit, D., Holz, A., Fetter, R., Doberstein, S., Paululat, A., Stadt, N., Skeath, J., Michelson, A., & Renkawitz-Pohl, R. 2001. *rolling pebbles (rols)* is required in *Drosophila* muscle precursors for recruitment of myoblasts for fusion. *Development*, **128**, 5061–5073.
- Reichert, N. 2004. *Entwicklung von Myotuben bei Drosophila melanogaster: Analyse zweier EMS induzierter Mutanten und Protein-Protein Wechselwirkungen zwischen Rolling pebbles und weiteren fusions-relevanten Proteinen*. Diplomarbeit Philipps-Universität Marburg.
- Ren, R., Mayer, B., Cicchetti, P., & Baltimore, D. 1993. Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science*, **259**, 1157–1161.
- Richardson, B., Beckett, K., Nowak, S., & Baylies, M. 2007. SCAR/WAVE and Arp2/3 are crucial for cytoskeletal remodeling at the site of myoblast fusion. *Development*, **134**, 4357–4367.
- Riechmann, V., Irion, U., Wilson, R., Grosskortenhaus, R., & Leptin, M. 1997. Control of cell fates and segmentation in the *Drosophila* mesoderm. *Development*, **124**, 2915–2922.
- Rosenberg-Hasson, Y., Renert-Pasca, M., & Volk, T. 1996. A *Drosophila* dystrophin-related protein, MSP-300, is required for embryonic muscle morphogenesis. *Mech. Dev.*, **60**, 83–94.
- Royer, L., & Rios, E. 2009. Deconstructing calsequestrin. Complex buffering in the calcium store of skeletal muscle. *J. Physiol.*, **587.13**, 3101–3111.
- Rubin, G., & Spradling, A. 1982a. Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science*, **218**, 348–353.
- Rubin, G., & Spradling, A. 1982b. Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science*, **218**, 341–347.
- Ruiz-Gomez, M., & Bate, M. 1997. Segregation of myogenic lineages in *Drosophila* required Numb. *Development*, **124**, 4857–4866.
- Ruiz-Gomez, M., Coutts, N., Price, A., Taylor, M., & Bate, M. 2000. *Drosophila* Dumbfounded: A myoblast attractant essential for fusion. *Cell*, **102**, 189–198.
- Ruiz-Gomez, M., Coutts, N., Suster, M., Landgraf, M., & Bate, M. 2002. *myoblasts incompetent* encodes a zinc finger transcription factor required to specify fusion-competent myoblasts in *Drosophila*. *Development*, **129**, 133–141.
- Rushton, E., Drysdale, R., Abmayr, S., Michelson, A., & Bate, M. 1995. Mutation in a novel gene, *myoblast city*, provide evidence in support of the founder cell hypothesis for *Drosophila* muscle development. *Development*, **121**, 1979–1988.
- Saiki, R., Gelfand, D., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G., Mullis, K., & Erlich, H. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487–491.
- Saitoh, O., Arai, T., & Obinata, T. 1988. Distribution of microtubules and other cytoskeletal filaments during myotube elongation as revealed by fluorescence microscopy. *Cell Tissue Res.*, **252**, 263–273.
- Sakashita, E., & Sakamoto, H. 1996. Protein-RNA and Protein-Protein interactions of the *Drosophila* sex-lethal mediated by its RNA-Binding Domains. *J. Biochem.*, **120**, 1028–1033.
- Sambrook, J., Fritsch, E., & Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Samuels, M., Deshpande, G., & Schedl, P. 1998. Activities of the sex-lethal protein in RNA binding and protein:protein interactions. *Nucl. Acids Res.*, **26**, 2625–2637.
- San-Martin, B., Ruiz-Gomez, M., Landgraf, M., & Bate, M. 2001. A distinct set of founders and fusion-competent myoblasts make visceral muscles in the *Drosophila* embryo. *Development*, **128**, 3331–3338.
- Sandona, D., Danieli-Betto, D., Germinario, E., Biral, D., Martinello, T., Liroy, A., Tarricone, E., Gastaldello, S., & Betto, R. 2005. The T-tubule membrane ATP-operated P2X4 receptor influences contractility of skeletal muscle. *FASEB J.*, **19**, 1184–1186.
- Sarikas, S., & Chlapowski, F. 1986. Effect of ATP inhibitors on the translocation of luminal membrane between cytoplasm and cell surface of transitional epithelial cells during the expansion-contraction cycle of the rat urinary bladder. *Cell Tissue Res.*, **246**, 109–117.
- Schafer, D., Gill, S.n, Cooper, J., Heuser, J., & Schroer, T. 1994. Ultrastructural analysis of the Dynactin complex: An actin-related protein is a component of a filament that resembles F-actin. *J. Cell Biol.*, **126**, 403–412.
- Schimmel, S., Hoffee, P., & Horecker, B. 1974. Deoxyribokinase from *Salmonella typhimurium*. Purification and properties. *Arch. Biochem. Biophys.*, **164**, 560–570.
- Schliwa, M., & Woehlke, G. 2003. Molecular motors. *Nature*, **422**, 459–465.
- Schröter, R., Lier, S., Holz, A., Bogdan, S., Klämbt, C., Beck, L., & Renkawitz-Pohl, R. 2004. *kette* and *blown fuse* interact genetically during the second fusion step of myogenesis in *Drosophila*. *Development*, **131**, 4501–4509.
- Schröter, R., Buttgereit, D., Beck, L., Holz, A., & Renkawitz-Pohl, R. 2006. Blown fuse regulates stretching and outgrowth but not myoblast fusion of the circular visceral muscles in *Drosophila*. *Differentiation*, **74**, 608–621.
- Schwaller, B. 2009. The continuing disappearance of "pure"Ca<sup>2+</sup> buffers. *Cell. Mol. Life Sci.*, **66**, 275–300.
- Schäfer, G., Weber, S., Holz, A., Bogdan, S., Schumacher, S., Müller, A., Renkawitz-Pohl, R., & Önel, S. 2007. The Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) is essential for myoblast fusion in *Drosophila*. *Dev. Biol.*, **304**, 664–674.
- Shelton, C., Kocherlakotka, K., Zhuang, S., & Abmayr, S. 2009. The immunoglobulin superfamily member Hbs functions redundantly with Sns in interactions between founder and fusion-competent myoblasts. *Development*, **136**, 1159–1168.
- Sigrell, J., Cameron, A., Jones, T., & Mowbray, S. 1997. Purification, characterization, and crystallization of *Escherichia coli* ribokinase. *Protein Sci.*, **6**, 2474–2476.
- Sigrell, J., Cameron, A., Jones, R., & Mowbray, S. 1998. Structure of *Escherichia coli* ribokinase in complex with ribose and dinucleotide determined to 1.8 Å resolution: insights into a new family of kinase structures. *Structure*, **6**, 183–193.
- Sigrell, J., Cameron, A., & Mowbray, S. 1999. Induced fit on sugar binding activates ribokinase. *J. Mol. Biol.*, **290**, 1009–1018.
- Sink, H. 2006. *Muscle development in Drosophila*. Springer + Business Media.
- Siomi, H., & Dreyfuss, G. 1997. RNA-binding proteins as regulators of gene expression. *Curr. Opin. Gen. Dev.*, **7**, 345–353.
- Snow, P., Bieber, A., & Goodman, C. 1989. Fasciclin III: a novel homophilic adhesion molecule in *Drosophila*. *Cell*, **59**, 313–323.
- Stathopoulos, P., Li, G., Plevin, M., Ames, J., & Ikura, M. 2006. Stored Ca<sup>2+</sup> depletion-induced oligome-

- rization of stromal interaction molecule 1 (STIM1) via EF-SAM region - an initiation mechanism for capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry. *J. Biol. Chem.*, **281**, 35855–35862.
- St.Cyr, J., Bianco, R., Schneider, J., Mahoney, J., Tveter, R., Einzig, S., & Foker, E. 1989. Enhanced high energy phosphate recovery with ribose infusion after global myocardial ischemia in a canine model. *J. Surg. Res.*, **46**, 157–162.
- Stossel, T. 1993. On the crawling of animal cells. *Science*, **260**, 1086–1094.
- Strünkelnberg, M., Bonengel, B., Moda, L., Hertenstein, A., Couet, G., Ramos, R., & Fischbach, K. 2001. *rst* and its paralogue *kirre* act redundantly during embryonic muscle development in *Drosophila*. *Development*, **128**, 4229–4239.
- Stute, C., Schimmelpfeng, K., Renkawitz-Pohl, R., Palmer, R., & Holz, A. 2004. Myoblast determination in the somatic and visceral mesoderm depends on Notch signalling as well as on *miliways* (*miliAlk*) as receptor for Jeb signalling. *Development*, **131**, 743–754.
- Suelter, C. 1970. Enzymes activated by monovalent cations. *Science*, **168**, 789–795.
- Takenawa, T., & Suetsugu, S. 2007. The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 37–48.
- Tam, P., Kanai-Azuma, M., & Kanai, Y. 2003. Early endoderm development in vertebrates: lineage differentiation and morphogenetic function. *Curr. Opin. Gen. Dev.*, **13**, 393–400.
- Tepass, U., & Hartenstein, V. 1994. The development of cellular junctions in the *Drosophila* embryo. *Dev. Biol.*, **161**, 563–596.
- Tupling, R. 2009. The decay phase of  $\text{Ca}^{2+}$  transients in skeletal muscle: regulation and physiology. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.*, **34**, 373–376.
- Uemura, Ta., Shepherd, S., Ackerman, L., Jan, L., & Jan, Y. 1989. *numb*, a gene required in determination of cell fate during sensory organ formation in *Drosophila* embryos. *Cell*, **58**, 349–360.
- van der Plas, M., Pilgram, G., Jong, A., Bansraj, M., Fradkin, L., & Noordermeer, J. 2007. *Drosophila* Dystrophin is required for integrity of the musculature. *Mech. Dev.*, **124**, 617–630.
- Volk, T. 1992. A new member of the spectrin superfamily may participate in the formation of embryonic muscle attachments in *Drosophila*. *Development*, **116**, 721–730.
- Wang, J., Dong, Z., & Bell, L. 1997. Sex-lethal interactions with protein and RNA. *J. Biol. Chem.*, **272**, 22227–22235.
- Watnick, T., Jin, Y., Matunis, E., Kernan, M., & Montell, C. 2003. A flagellar Polycystin-2 homolog required for male fertility in *Drosophila*. *Curr. Biol.*, **13**, 2179–2184.
- Weiss, J., Suyama, K., Lee, H., & Scott, M. 2001. Jelly belly: A *Drosophila* LDL receptor repeat-containing signal required for mesoderm migration and differentiation. *Cell*, **107**, 387–398.
- White, J., & Munro, S. 2001. The Sec34/35 Golgi transport complex is related to the exocyst, defining a family of complexes involved in multiple steps of membrane traffic. *Dev. Cell*, **1**, 527–537.
- Wierach, B. 2005. *Charakterisierung von bubbles, einem Gen für Zelldifferenzierung in der Myogenese von Drosophila melanogaster und die Analyse von Protein-Interaktionen von Rolling pebbles unter Anwendung des Cyto Trap®-Systems*. Diplomarbeit Philipps-Universität Marburg.
- Wigglesworth, V. 1972. *The Principles of Insect Physiology*.
- Williamson, M. 1994. The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochem. J.*, 249–260.
- Wolfstetter, G., Shirinian, M., Stute, C., Grabbe, C., Hummel, T., Baumgartner, S., Palmer, R., & Holz, A. 2009. Fusion of circular and longitudinal muscles in *Drosophila* is independent of the endoderm but

- further visceral muscle differentiation requires a close contact between mesoderm and endoderm. *Mech. Dev.*, **126**, 721–736.
- Wu, X., Jung, G., & Hammer, J. 2000. Functions of unconventional myosins. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **12**, 42–51.
- Yin, Z., & Frasch, M. 1998. Regulation and function of *tinman* during dorsal mesoderm induction and heart specification in *Drosophila*. *Gen. Dev.*, **22**, 187–200.
- Zhuang, S., Shao, H., Guo, F., Trimble, R., Pearce, E., & Abmayr, S. 2009. Sns and Kirre, the *Drosophila* orthologs of Nephrin and Neph1, direct adhesion, fusion and formation of a slit diaphragm-like structure in insect nephrocytes. *Development*, **136**, 2335–2344.
- Zweifach, A., & Lewis, R. 1993. Mitogen-regulated  $\text{Ca}^{2+}$  current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 6295–6299.

## Abbildungsverzeichnis

1	Die Entstehung der Muskeln vollzieht sich in mehreren Schritten . . . . .	4
2	Drei larvale Muskeltypen von <i>Drosophila melanogaster</i> . . . . .	5
3	Der Jeb-Alk Signalweg . . . . .	6
4	Das Modell der zweistufigen Myoblastenfusion . . . . .	9
5	Die Regulation von F-Aktin während der Myoblastenfusion . . . . .	11
6	Schematische Darstellung der ultrastrukturellen Eigenschaften während des zweiten Schrittes der Myoblastenfusion . . . . .	13
7	Die Struktur eines <i>E. coli</i> Ribokinase-Monomers . . . . .	15
8	Der Ribokinase-Dimer aus <i>E. coli</i> zeigt verschiedene Charakteristika . . . . .	16
9	STIM1 und die SOC-Aktivierung . . . . .	18
10	Das UAS-Gal4 System . . . . .	39
11	Die EMS-Mutante <i>E832</i> zeigt Defekte in der somatischen Muskulatur . . . . .	44
12	Die somatischen Founderzellen sind in <i>E832</i> -Embryonen ab Stadium 15/16 reduziert, während die somatischen FCMs in Stadium 9/10 normal gebildet werden . . . . .	45
13	Das viszerale Mesoderm in <i>E832</i> -homozygoten Embryonen zeigt deutliche Störungen in seiner Differenzierung . . . . .	47
14	Die viszeralen FCs in der Mutante <i>E832</i> erscheinen im Vergleich zum Wildtyp in ihrer Anzahl in Stadium 9/10 erhöht . . . . .	48
15	Das <i>E832</i> -Chromosom enthält zwei Bereiche mit Letalmutationen, die in homozygoter Situation zu Myogenese-Störungen führen . . . . .	50
16	Embryonen von <i>E832/Df(2L)ED775</i> und <i>E832/Df(2L)32FP01</i> zeigen Fehlentwicklungen in der Muskulatur . . . . .	52
17	<i>32F-sm</i> und <i>bubbles</i> <sup>33E-m</sup> zeigen einen somatischen Muskel-Phänotyp . . . . .	55
18	Die Phänotypen der homozygoten Mutanten ähneln in Stadium 15/16 denen der Transheterozygoten der Mutanten mit den jeweiligen Defizienzen bzw. mit <i>E832</i> . . . . .	56
19	Das viszerale Mesoderm ist nur in <i>33E-vm</i> sichtbar verändert . . . . .	58
20	Die Konstriktionen werden in mutanten Embryonen von <i>bubbles</i> <sup>33E-m</sup> und <i>33E-vm</i> teilweise nicht korrekt gebildet . . . . .	59
21	Alk ist in <i>bubbles</i> <sup>33E-m</sup> -Mutanten normal exprimiert, während in <i>33E-vm</i> -Mutanten eine vermehrte Expression von Alk vorliegt . . . . .	60
22	Anzahl der rP298lacZ-positiven Kerne ist in Stadium 16 in <i>bubbles</i> <sup>33E-m</sup> -Embryonen deutlich reduziert . . . . .	61
23	In <i>bubbles</i> <sup>33E-m</sup> -Mutanten sind in Stadium 14 vermehrt Makrophagen und nicht fusionierende FCMs vorhanden, aber zeigen eine korrekte Adhäsion zwischen FCM und wachsenden Myotuben . . . . .	63

24	Der genomische Bereich 32F2-33A1 umfasst eine Vielzahl von Genen . . . . .	65
25	Die meisten RNAs ausgewählter Gene aus der Region 32F2-33A1 sind nicht im Mesoderm exprimiert . . . . .	66
26	RNA-Interferenz mit dem CG4983-Transkript zeigt in Stadium 16 Defekte im Mesoderm	68
27	Die Embryonen der P-Element-Mutante von <i>Arp1</i> zeigen ein wildtypisches Muskelmuster während die <i>Arp1</i> <sup>1</sup> -mutanten Embryonen Defekte in der somatischen Muskulatur aufweisen . . . . .	69
28	Die mRNAs von <i>Arp1</i> - und <i>Msp-300</i> sind in späten Embryonalstadien in der somatischen Muskulatur exprimiert . . . . .	70
29	Der genomische Bereich von 33E1-33E3 umfasst sechs putative Gene . . . . .	71
30	<i>CG31862</i> ist in den Tracheen transkribiert . . . . .	72
31	Die mRNA von <i>bruno-2</i> ( <i>bru-2</i> ) ist im Endoderm und den Malpighi-Gefäßen transkribiert . . . . .	73
32	<i>CG31763</i> ist in den Garlandzellen, im Hinterdarm und den Speicheldrüsen exprimiert und <i>CG31763</i> -defiziente Embryonen weisen keine Garlandzellen auf . . . . .	75
33	<i>Pkd2</i> ist in den Garlandzellen und dem Proventrikulus exprimiert und <i>Pkd2</i> -defiziente Embryonen zeigen keine differenzierten Garlandzellen . . . . .	76
34	<i>D-Rbks</i> <sup>33E</sup> ist während der ganzen Embryonalentwicklung in <i>Drosophila</i> exprimiert .	78
35	Die mesodermale Expression durch UAS-D-Rbks <sup>33E</sup> /24BGal4 im homozygoten <i>bubbles</i> <sup>33E-m</sup> -Hintergrund rettet den somatischen Phänotyp . . . . .	79
36	Die Sequenzierung von <i>D-Rbks</i> <sup><i>bubbles</i>33E-m</sup> ergibt eine Basendeletion an Position 494 .	81
37	Die Überexpressionsstudien zeigen, dass D-Rbks <sup>33E</sup> eventuell in den FCs benötigt werden könnte . . . . .	82
38	Die Homologien zwischen den Ribokinasen aus anderen Organismen und D-Rbks <sup>33E</sup> sind sehr hoch . . . . .	84
39	<i>kosh</i> wird während der Stadien der Myoblastenfusion exprimiert . . . . .	86
40	Die Übersichtsdarstellung zeigt die drei Bereiche des <i>E832</i> , in denen Myogenese-relevante Mutationen aufgedeckt wurden. . . . .	89
41	Eine mögliche Einbindung von <i>Arp1</i> über den Dynein-Dynactin-Komplex in die Abläufe Mikrotubuli-basierter Transporte . . . . .	93
42	Die fünf Hypothesen einer Erklärung für eine potentielle Funktion von D-Rbks <sup>33E</sup> in der Myogenese . . . . .	104
43	Die EF-Hand-Domäne besitzt eine charakteristische Molekülanordnung . . . . .	109
44	Der Vergleich zwischen der Originalsequenz von D-Rbks <sup>33E</sup> mit der Sequenz von D-Rbks <sup><i>bubbles</i>33E</sup> . . . . .	116

## Danksagung

- Ein großes Dankeschön an Frau Prof. Renate Renkawitz-Pohl für die Ermöglichung dieser Arbeit, die Bereitstellung des Themas und die vielen aufbauenden und hilfreichen Diskussionen, auch wenn es mal nicht so rosig aussah.
- Frau Prof. Monika Hassel danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.
- Danke an Detlev Buttgerit: 1. natürlich für die Färbungen und 2. ich glaube, dass ich ohne dich nicht so kritikfähig geworden wäre.
- Ebenfalls mit einer großen Umarmung bedanke ich mich bei Ruth und Inge, Sabina, Nadine, Tim und Katharina für die Hilfe bei Verschicken von Paketen, das Flaschengießen, das Auskratzen und das ganze Drumherum.
- Danke an das gesamte Labor 3020 (Susi, Bettina, Christina, Anja, Matthias; ehemals Dörthe und Nina). Was wäre denn aus dem Labor ohne unsere Putzattacken geworden?
- Danke für die Kaffeepausen, Grillmitage, Weihnachtsfeiern und sonstiges auch an die anderen Labore 3008 und 3064.
- Gritt: obwohl du jetzt nicht mehr da bist, kommt an den Montag-Abenden immer noch so ein Heißhunger auf Pizza und Wein (aber NICHT auf Tequila!). Danke für deine Diskussionen und sonstigen Tratsch-Attacken....
- Katja: egal, wo es mich hinverschlägt, ich werde jeden (oder fast jeden) Morgen einen Espresso oder Tee auf dich trinken!
- Einen speziellen Dank an diejenigen, welche sich dieses Machwerk vor Beendigung durchlesen mussten (Katja, Bettina und André) oder wollten (Gritt)
- Natürlich danke ich meinen Eltern für die Rückendeckung und Suppen-, Marmeladen- und Stippgrützenverpflegung; Christine für die erholsamen Wochenenden und supertollen Konzerte; Pete, Dorothea mit Maximilian und Charlotte für die tollen Emails mit Kinderfotos, die meine Bürowände verziert haben
- Benni Pollack und die Mitglieder des Ivrit-Kurses für die Ablenkung an den Mittwoch-Abenden. Danke, dass ihr mir gezeigt habt, dass es eine Welt jenseits jedes Labors gibt. Toda Raba!
- Am Ende danke ich dem wichtigsten Menschen in meinem Leben: André. Keine Worte der Welt könnten das beschreiben, was du für mich bedeutest.

# Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

**Die Analyse einer Ribokinase als neue myogenese-relevante Komponente und erste Hinweise auf eine Beteiligung von  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Faktoren in der Myogenese von *Drosophila melanogaster***

unter der Leitung von Frau Prof. Dr. R. Renkawitz-Pohl (Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg) selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich angegebenen Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den



## Lebenslauf

### persönliche Daten:

Name:	Griemert
Geburtsname:	Wierach
Vorname:	Barbara
Geburtsdatum:	18.10.1980
Geburtsort:	Bremerhaven

### Bildungsweg:

1986-1991	Grundschule Werste, Bad Oeynhausen
1991-2000	Immanuel-Kant Gymnasium, Bad Oeynhausen
2001-2005	Studium der Biologie mit Abschluss Diplom, Philipps-Universität Marburg
2006-2010	Promotion im Fach Entwicklungsbiologie unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl, Philipps-Universität Marburg